

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 6 月 13 日 (13.06.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
**WO 02/46355 A1**

(51) 国際特許分類: **C12M 1/32**, 1/34, G01N  
33/48, 33/49, B81B 1/00, B81C 5/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/10683

(22) 国際出願日: 2001 年 12 月 6 日 (06.12.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-372467 2000 年 12 月 7 日 (07.12.2000) JP  
特願2000-377120 2000 年 12 月 12 日 (12.12.2000) JP  
特願2001-209743 2001 年 7 月 10 日 (10.07.2001) JP  
特願2001-258526 2001 年 8 月 28 日 (28.08.2001) JP  
特願2001-313205 2001 年 10 月 10 日 (10.10.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 エフェクター細胞研究所 (EFFECTOR CELL INSTITUTE) [JP/JP]; 〒153-0041 東京都目黒区駒場 4-6-2 メゾン駒場401号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 金ヶ崎士朗 (KANEGASAKI, Shiro) [JP/JP]; 〒214-0032 神奈川県川崎市多摩区枳形1丁目21-2-503 Kanagawa (JP). 菊

池佑二 (KIKUCHI, Yuji) [JP/JP]; 〒301-0001 茨城県竜ヶ崎市久保台4丁目1-10-2-506 Ibaraki (JP). 菊池裕子 (KIKUCHI, Hiroko) [JP/JP]; 〒047-0264 北海道小樽市桂岡町14番30 Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 成瀬勝夫, 外 (NARUSE, Katsuo et al.); 〒105-0003 東京都港区西新橋2丁目11番5号 セントラル新橋ビル5階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: WELL UNIT FOR DETECTING CELL CHEMOTAXIS AND SEPARATING CHEMOTACTIC CELLS

(54) 発明の名称: 細胞走化性検出及び走化細胞分離装置のためのウエルユニット

(57) Abstract: It is intended to provide a well unit to be used in fabricating an apparatus whereby movements of cells based on their own power can be accurately and easily detected in order to detect cell chemotaxis due to a chemotactic factor or inhibition of cell chemotaxis by an inhibitor. Namely, a well unit to be used in an apparatus for detecting cell chemotaxis and separating cells characterized in that a plural number of wells, in which a liquid sample can be contained in a static state, are connected to each other via channels, the channels are provided with banks, and in the upper part of the banks, one or more grooves having a width and/or a depth fit for the size or deformability of cells are formed, or a plane is formed in such a manner that there is a space between the plane and a glass substrate having a depth fit for the size or deformability of the cells.

[続葉有]



WO 02/46355 A1



---

(57) 要約:

本発明は、走化性因子による細胞の走化性又は阻害剤による細胞の走化性阻害を検出するに当たり、細胞の自力に基づく動きを正確にしかも容易に検出しうる装置を組立てるために用いられるウェルユニットを提供することを目的とする。

即ち、本発明は、液体試料を静止した状態で収納できるウェルの複数個が流路を介して互いに連通していること、流路には土手が設けられていること、土手の上部には細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する障壁が設けられているか、又は平面が設けられており、該平面はガラス基板との間で細胞の径又はその変形能に合わせた深さを形成するべく設けられていることを特徴とする細胞走化性検出及び細胞分離装置のためのウェルユニットである。

## 明 細 書

## 細胞走化性検出及び走化細胞分離装置のためのウエルユニット

## 技 術 分 野

本発明は、細胞が自力で一定の方向に移動するか否かの判定、細胞が自力で一定の方向に移動する状態の観察、或いは一定の方向に自力で移動した細胞の数を計数するための装置、即ち、細胞走化性検出装置、更には、細胞が選択的に自力で一定の方向に移動することを利用する細胞の分離装置において用いられるウエルユニットに関わる。

## 背 景 技 術

細胞の走化性を *in vitro* で検出する装置としてボイデンチェンバーが使用されてきた。これは、細胞が通過できる大きさの穴（直径  $3 \sim 8 \mu\text{m}$ ）があいているフィルターで上室と下室とに2分された構造を有し、上室に細胞浮遊液を、下室に走化性因子を含む検体溶液を入れ、走化性因子に向かって移動する細胞がフィルターを通過し又はフィルターの裏面に現れた数を観察する装置である。今日最も普通に使用されている装置であるが、細胞浮遊液の量として、 $1 \times 10^6 \text{ cells/ml}$  の濃度の浮遊液を  $1/4 \text{ ml} \sim 1/20 \text{ ml}$  要する。これは、細胞数にして、少なくとも  $5 \times 10^4$  個を必要とすることを意味す

る。多量に得られる細胞を対象とする場合はさしたる問題はないが、例えば、好酸球は抹消血白血球に占める割合が1～5%程度、好塩基球は同じく1%以下、単球は同じく1～2%程度であり、この様な少量のみ存在する細胞を対象とする場合は、必要量を手に入れるために多くの労力を要する。また、マウスのような小動物を用いる場合、採血可能な量は限られており、一頭あたりせいぜい1.0ml程度である。更に、がん細胞や組織に存在する細胞にも多量には入手しにくい細胞があり、その性質を調べるには使用量が少ないことが望まれる。また、ボイデンチェンバーにおいては、移動する過程にある細胞の状態の観察や数の計数をすることができない。

細胞の走化性を数個のレベルで観察できる定性用スライドグラスが市販されている。これは、25×75mm、2mm厚の顕微鏡ガラススライド上に、1mm幅のブリッジ（流路）を挟んで幅4mm、長さ25mm、深さ1mmの溝（ウェル）が2個設けられている。即ち、二つのウェルが流路を挟んで連通した形を有している。一方のウェルに細胞浮遊液を入れ、他方のウェルに走化性因子を含有する検体溶液を入れ、カバーグラスを被せて、一方のウェルから流路を越えて他方のウェルへ移動する細胞を顕微鏡で観察する。然し、ブリッジが細胞の径又は変形能に合わせた空間を形成することは想定されていない。また、流路に細胞が通過する溝は設けられていない。更に、一個のウェルの容積が100 $\mu$ lであり、少なくとも1/10mlの細胞浮遊液を要する。また、同様な構造の

ものとして、スライドガラス上に、同心円状に二つの溝（ウェル）を設け、その間をブリッジ（流路）で隔てたケモタキシスチャンバーが市販されている（ウェーバーサイエンティフィック社製、商品名 ダンケモタキシスチャンバー）。これは、内側のウェルに細胞浮遊液を、外側のウェルに検体を夫々入れ、カバーガラスを被せて、流路を通過する細胞を顕微鏡で観察するものである。流路はカバーガラスより  $20\mu\text{m}$  低く設定されており、細胞はその隙間を通過する構造である。ここで、流路の平面とカバーガラスとの間で形成される距離は細胞の径又は変形能とは無関係に設定されており、また、流路には細胞が通過する溝が設けられていない。

血液レオロジーの計測のために、シリコン単結晶基板表面に半導体作製技術を利用して微細な溝を複数本設けてなる流路を備えた装置が提案されている（Kikuchi 他、SPIE Vol.2978, 165 - 171(1997)、Kikuchi 他、Microvascular Research Vol.44, 226-240(1992)、菊池他、生物物理 214 号 254-258(1997)）。これは、流路を挟んで圧力差を与えることにより血球浮遊液の流れを作り、血流の状況を観察し研究しようとするもので、細胞レベルでの挙動を観察することを可能とするものであるが、血球の自力による移動を観察乃至計測する構造を採用するものではない。

日本特許 2532707 号には、一端部に流入口を有し、他端部に流出口を有する大きな溝を並列に配置し、且つ、この溝を区画する障壁に、前記流入口と流出口とを結ぶ

直線に対し直交する方向において、溝相互を連通する微小な溝を設けてなる血液回路が開示されている。これは、大きな溝の一つに血液試料を流し、他方の溝に走化性因子を含む検体を流しておき、血液試料の一部のみを微細な溝（流路）に導き、微細な溝（流路）を通過する細胞を検出することで、細胞の動きや機能をチェックし、或いは遊走性を観察・測定するものである。大きな溝により血液試料及び走化性因子を含む検体が循環する流れを作るため、血液試料や検体溶液を静止した状態で収納するウェルを有さず、また、血液試料及び検体が相当量必要であり、微量な試料を用いて細胞の自力による動きを調べるには不向きである。

血液中の細胞を微細な溝を通過させ、通過中の血球の態様を観察するための血液フィルタが知られている（日本特許 2685544 号）。これは、シリコン基板表面に微細な溝を有してなる第 1 の基板と、第 1 の基板の表面に接合される平面を有する第 2 の基板とからなり、両基板の接合部に第 1 の基板の溝によって形成される空間を血球が通過する構造である。然し、血球を微細な溝を通過させるために加圧又は吸引等外部から力を加えており、細胞の自力による溝の通過を観察するものではない。即ち、血液試料や検体溶液を静止した状態で収納するウェルを有さない。

細胞膜の硬さや細胞の変形能の機能的な側面での分画処理を行うために、分画処理すべき細胞を多数の微細な溝を有する流路を通過させ、通過し得ない細胞と通過す

る細胞とを分ける装置も知られている。その中で、溝の幅が異なる流路を２段に設け、何段階かに細胞を分画することも提案されている（日本特許 2685119 号）。然し、これは細胞を含む液を加圧下に移動させる構造であり、細胞の自力による移動を捉えるものではない。

微細な溝を設けた流路を有する基板を積重ね、多量の細胞懸濁液を濾過、分画可能とした積層マイクロチャネルアレイ装置も知られている（日本特許公開 165062／1999）。これも、細胞を含む液を加圧下に移動させる構造であり、細胞の自力による移動を捉えるものではない。

#### 発 明 の 開 示

本発明は、走化性因子による細胞の走化性又は阻害剤による細胞の走化性阻害を検出するに当たり、細胞の自力に基づく動きを正確にしかも容易に検出しうる装置のためのウエルユニットを提供することを目的とする。ここに、自力に基づく動きとは、圧力等の影響を受けることなく、細胞が自らの運動により移動する状態を意味し、走化性因子の作用を高い信頼度で検証し、確認するために重要な事項である。かかる細胞の自力に基づく動きを正確に検出するためには、ウエルに入れた細胞が、走化開始前に流路の近傍に集まり、細胞の進行方向に向かって並ぶことが重要であるが、かかる状態を微細なウエル内で作り出すことができるウエルユニットの構造は知られていない。

また、本発明は、少量の細胞試料を用いて細胞の走化

性を検出することができる装置のためのウエルユニットを提供することを目的とする。加えて、本発明は、細胞の走化性物質及びそれを阻害する物質の検索を、一度に多数の検体につき、効率よく行う装置のためのウエルユニットの提供を目的とする。更に、本発明は、複数種の細胞の混合液から特定の細胞を選択的に分離採取する装置のためのウエルユニットを提供すること、その目的の一つとする。

即ち、本発明は、液体試料を静止した状態で収納できるウエルの複数個が流路を介して互いに連通していること、流路には土手が設けられていること、ウエルはガラス基板と密着するように形成されていること、土手の上部には細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する障壁が設けられているか、又は平面が設けられており、該平面はガラス基板との間で細胞の径又はその変形能に合わせた深さを形成するべく設けられていることを特徴とする細胞走化性検出及び細胞分離装置のためのウエルユニットであり、また、液体試料を静止した状態で収納できるウエルの複数個が流路を介して互いに連通していること、流路には土手が設けられていること、土手の上部には細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する障壁が設けられていることを特徴とする該ウエルユニットである。かかる、土手を設けること、或いは土手に溝を構成する障壁を設けることにより、ウエルに入れた細胞が、走化開始前に流路の近傍に集まり、細胞の



進行方向に向かって並ぶという状態が容易に作り出される。この効果は、土手の上部に、細胞をスタートラインに並べる際に細胞の移動を制限するための障害物を相対するウエルに向かう方向に直交して設けること、或は、土手の上部に、細胞をスタートラインに並べる際に細胞の移動を制限するための障害物を、障壁の列に並行して設ける構造を採用することにより、更に高められる。

ここで、複数のウエルは、流路を介して直列に連通していることができ、或いは、1つのウエルに複数のウエルが流路を介して連通していてもよく、更には、1つのウエルに流路を介して連通している複数のウエルの内、少なくとも2つのウエルが流路を介して更に他の共通のウエルと連通していてもよい。

上記の複数のウエルは、細胞浮遊液を収納するウエル及び走化性因子を含有する溶液を収納するウエルであり、或いは、細胞浮遊液を収納するウエル、走化性因子を含有する溶液を収納するウエル及び走化性因子阻害剤を含有する溶液を収納するウエルである。

本発明のウエルユニットは、流路を介して互いに連通しているウエルの何れか一方又は双方において、流路の近傍における液体の量を制限するために、流路に直交して壁を設けることができ、更には、このウエルユニットにおいて、流路に直交して設けられている何れか一方又は双方の壁のまでテラスが形成されていてもよい。

本発明のウエルユニットにおける土手の上部の何れかの箇所に、細胞を検出する画面の位置決めを行うための

印を設けることができ、また、流路において、土手が多段に形成されていてもよい。

本発明のウエルユニットにおいて、流路に設けられている溝が、相対するウエルに向かう方向に直交する1乃至複数本の溝で互いに連通していることができ、或いは、流路において、相対するウエルに向かう方向の複数本の溝の幅が、これに直交する1乃至複数の溝を横切る度に段階的に変化すること、更には、流路において、相対するウエルに向かう方向の複数の溝が、これに直交する1乃至複数本の溝を横切る度に、相互の位置をシフトさせて形成されていることができる。

本発明のウエルユニットにおける流路において、細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する障壁の一連の列の前後にテラスが設け、且つ、細胞の進行方向におけるテラスの長さが他方のテラスの長さより長することができる。

本発明のウエルユニットの流路においては、中央にテラスを設け、細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する障壁の列が該テラスを挟んで2箇所形成されており、所望により、障壁の列の外側にもテラスが設けられていてもよい。

本発明に関わる上記の各ウエルユニットの夫々を1ユニットとし、同一又は複数種のユニットを複数個集積して細胞走化性検出及び細胞分離装置のためのウエルユニットとすることもできる。

### 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明に関わるウエルユニットの使用態様の例を示す断面図である。

図 2 は、本発明に関わるウエルユニットの一例を示す上面図である。

図 3 は、本発明に関わるウエルユニットの使用態様の例を示す断面図である。

図 4 は、本発明に関わるウエルユニットの一例を示す上面図である。

図 5 は、本発明に関わるウエルユニットの使用態様の他の例を示し、(1)は装置の断面図であり、(2)は本発明に関わるウエルユニットの一例を示す上面図である。

図 6 は、本発明に関わるウエルユニットの使用態様の他の例を示し、(1)は装置の断面図であり、(2)は本発明に関わるウエルユニットの一例を示す上面図である。

図 7 は、本発明のウエルユニットの一例であり、流路を介してウエルが直列に 3 個連通している場合を示す。

図 8 は、本発明のウエルユニットの一例であり、貫通孔を有するウエルが流路を介して直列に 3 個連通している場合を示す。

図 9 は、本発明のウエルユニットの一例であり、1 つのウエルに複数のウエルが流路を介して連通している場合を示す。

図 10 は、本発明のウエルユニットの一例であり、1 つのウエルに複数のウエルが流路を介して連通しており、ウエルに貫通孔が設けられている場合を示す。

図 11 は、本発明のウエルユニットの一例であり、1つのウエルに複数のウエルが流路を介して連通しており、ウエルに貫通孔が設けられている場合を示す。

図 12 は、本発明のウエルユニットの一例であり、1つのウエルを中心にして、複数のウエルが流路を介して連通している場合であって、全体として円形を構成している場合を示す。図は貫通孔が設けられている例を示す。

図 13 は、本発明のウエルユニットの一例であり、1つのウエルを中心にして、複数のウエルが流路を介して連通している場合であって、全体として円形を構成している場合を示す。

図 14 は、1つのウエルを中心にして、複数のウエルが流路を介して連通していると共に、それら複数のウエルの内、2つづつが更に他の共通のウエルと流路を介して連通している場合を示す。図は貫通孔が設けられている例を示す。

図 15 は、流路に直交して壁が設けられたウエルユニットの例を示す図である。

図 16 は、流路に直交して壁が設けられたウエルユニットの他の例を示す図である。

図 17 は、流路の構造の一例を示す。

図 18 は、流路の構造の一例を示す。

図 19 は、流路の障壁の配列例。図において、矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

図 20 は、図 19 の断面図を示す。

図 21 は、流路を挟んで相対するウエルに向かう方向

の溝が、これに直交する 1 本の溝で連通している場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

図 22 は、流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝が、これに直交する 2 本の溝で連通している場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

図 23 は、流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝が、これに直交する 2 本の溝で連通していると共に、相対するウエルに向かう方向の溝の幅が直交する溝を横切るごとに段階的に変化する場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。図は、障壁自体の幅が変化する場合を示す。

図 24 は、図 8 の変形例で、障壁の大きさは同じであるが、その数が増減する場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

図 25 は、流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝が、これに直交する 3 本の溝で連通していると共に、相対するウエルに向かう方向の溝が、これに直交する溝を横切るごとに相互の位置関係を変えている場合を示す。図では、2 分の 1 ピッチ、直行する方向にシフトしている場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

図 26 は、障壁が相対するウエルに向かう方向に繋がっている場合を示す。

図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

図 27 は、土手に、障壁の列の両側にテラスを設け、一方が他方より長い場合を示す。図中矢印は相対するウ

エルに向かう方向を示す。

図 28 は、土手の中央にテラスを設け、テラスをはさんで障壁の列を 2 箇所形成した例を示す。

図 29 は、流路に直交して壁が設けられたウエルユニットの流路において、壁までテラスが設けられている例を示す。

図 30 は、流路に直交して壁が設けられたウエルユニットの流路において、壁までテラスが設けられている他の例を示す。

図 31 は、流路に直交して壁が一方のウエルにのみ設けられたウエルユニットの流路において、壁までテラスが設けられている例を示す。

図 32 は、流路における土手が多段に形成されている場合を示す。

図 33 は、多数ユニットの集積例であり、同一タイプのユニットの集積例を示す。

図 34 は、多数ユニットの集積例であり、同一タイプのユニットの集積例を示す。

図 35 は、多数ユニットの集積例であり、図 15 のウエルが集積配置された例を示す。

図 36 は、多数ユニットの集積例であり、円形タイプの集積例を示す。

図 37 は、多数ユニットの集積例であり、異なったタイプのユニットの集積例を示す。

図 38 は、流路及びウエルを作製する工程の一例を示

す

図 39 は、細胞走化性検出及び走化細胞分離装置の組立例を示す図であり、(1)は部品毎の斜視図、(2)は対応する断面図である。

図 40 は、土手に、細胞の移動を制限するための障害物を設ける場合の例を示す。

〔符号の説明〕

1 : 流路

2 : ウエル。添字の A、B、 $B_1 - n$ 、C はウエルの区別を意味する(以下同じ)。

3 : 試料注入・採取用管。添字の a は管 3 に対応する貫通孔。添字の b は管 3 の上端部。

4 : 試料の注入・採取時における昇圧・減圧を回避するための管。添字の a は管 4 に対応する貫通孔。添字の b は管 4 の上端部。

5 : 流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝

6 : 障壁

7 : 基板

8 : ガラス基板

9 : 管を穿ったブロック

10 : 土手

11、 $11 - 1 \sim 4$  : テラス

12 : 溝 5 に直交する溝

13 : 検出器

14 : 流路に直交して設けられた壁

15 : 管 3、4 の上端部により共有される空間

- 1 6 : パッキング
- 1 7 : カバーキャップ
- 1 8 : Oーリング
- 1 9 : ガイドピン受孔
- 2 0 : ガイドピン
- 2 1 : 中間支持体
- 2 2 : 底支持体
- 2 3 : 画面の位置決めのための印
- 2 4 : 障害物

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明に関わる細胞走化性検出及び走化細胞分離装置のためのウエルユニットは、複数のウエルが流路を挟んで結合し、互いに連通する構造を有する。ここで、ウエルとは、細胞懸濁液又は細胞走化性因子や走化性因子阻害剤等の検体溶液を収納する容器である。流路とは、二つのウエルを連通させている部分であって、一つのウエルから他方のウエルに細胞が移動するときに細胞が通過する通路である。流路には、後述する土手が設けられ、土手には、細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する障壁が設けられているか、又は平面が設けられており、該平面はガラス基板との間で細胞の径又はその変形能に合わせた深さを形成するべく設けられている。なお、細胞の変形能とは、細胞が弾力性を有するものであるとき、その弾力性のために容易に形を変え、扁平状やひも状などの形態をとり、通常、細胞が自由空間でとる形状（球状）において有す



る径よりも狭い隙間を通り抜けることを言う。

かかる隙間を設けることにより、細胞が隙間という障害を越えて移動することになり、細胞の自力による移動に障害を加えることで、より正確に細胞の走化性を判定することが可能となる。かかる隙間を形成するために、土手を設けること、或いは土手に溝を構成する障壁を設けることにより、ウェルに入れた細胞が、走化開始前に流路の近傍に集まり、細胞の進行方向に向かって並ぶという状態が容易に作り出される。更に、細胞が個体毎に通過する溝を設ける場合は、細胞を個々のレベルで観察することが可能となり、又、細胞を所望の種類ごとに分離することができる。

本発明は、かかる細胞走化性検出及び走化細胞分離装置において用いられるウェルの結合様式、ウェルの構造及び流路の構造に関する。

図 1 は、本発明のウェルユニットが組み込まれた細胞走化性検出及び細胞分離装置の一例を示し、図 2 は図 1 の装置で用いられるウェルユニットの上面図である。図の例では、ウェルユニットは、細胞浮遊液や検体溶液等の試料を収納するウェル 2 A、2 B を有し、これ等のウェルを隔てる土手 10 の上面に溝 5 を構成する障壁 6 が設けられている。ウェルユニットには光学的に透明なガラス基板 8 が密着して装着され、密閉された空間を構成する。なお、本明細書においては、土手 10 と溝 5 を構成する障壁 6 を含む部分構造を流路と呼ぶこととする。ウェル 2 の一つ（2 A）に細胞浮遊液を入れたとき、細

胞は、他方のウエル（２Ｂ）の検体溶液が走化性因子である場合はウエル２Ｂに向かって移動しようとし、流路を通過する。細胞の移動の状態は検出器１３、例えば顕微鏡により観察される。この装置の他の用途として、ウエル２Ａに種々の細胞の混合懸濁液を入れておき、ウエル２Ｂに特定の走化性因子を入れることにより、ウエル２Ａからウエル２Ｂに移動した細胞を採取することで、走化性因子に反応する細胞を選択的に分離することを挙げることができる。

図３は、本発明のウエルユニットが組み込まれた細胞走化性検出及び細胞分離装置の他の例を示す。１は流路、２Ａ、２Ｂは細胞浮遊液や検体溶液等の試料を収納するウエルであり、試料はマイクロピペット等により管３Ａ又は３Ｂを通じてウエル２Ａ又は２Ｂに供給される。移動後の細胞をウエル２Ａ又は２Ｂから採取する場合も、マイクロピペット等により管３Ａ又は３Ｂを通じて行われる。

試料の一つである細胞浮遊液を、マイクロピペット等により管３Ａを通じてウエル２Ａに供給する際、注入する液圧により細胞が流路１を通過して反対側のウエル２Ｂに移動してしまうことが生じる。これは、細胞の移動が検体の有する走化性によるのか否かの判定に混乱を与える要因となるとともに、細胞の分離を目的とする場合は、所望の細胞に他の細胞が混合してしまうことになり目的が達せられないことになる。同様に、検体溶液を、マイクロピペット等により管３Ｂを通じてウエル２Ｂに

供給する際、注入圧により検体溶液が流路 1 を通って反対側のウエル 2 A に入り細胞浮遊液と混合する事態が生じ、細胞がその走化性により流路 1 を通過する現象が混乱乃至阻害される。

この問題点を解決するために、管 3 と連通するように管 4 を設け、管 3 に加わる注入圧を管 4 の方向に逃がし、流路 1 に向かって細胞が強制的に流れることを防止する構造が採用される。即ち、試料を注入する管 3 に連通する管 4 を設けることにより、水平方向への液圧の影響を最小にすることができ、検体溶液が細胞走化性を有するか否かの判定をより正確に行うことができる。管 4 による圧力差の緩和作用は、ウエルから細胞などの試料を採取する際の減圧を緩和する上でも有効であり、試料の採取を容易にする。

本発明は、かかる装置においても使用できるウエルユニットを提供する。図 4 には、かかる装置において使用できる本発明のウエルユニットの一例が示されており、ウエル 2 A には、管 3 A、4 A を設けるための貫通孔 3 A a、4 A a が、ウエル 2 B には、管 3 B、4 B を設けるための貫通孔 3 B a、4 B a が、夫々、設けられている。

図 5 (1)、(2) は、本発明のウエルユニットが組み込まれた細胞走化性検出及び細胞分離装置の他の例を示す。図 5 の装置においては、ウエルに試料を注入し、或いはウエルから試料を採取する際の圧力の影響を少なくするために、図 5 (1) に示すように、管 3 A、3 B の上端部

3 A b 及び 3 B b により共有される空間 15 が設けられている。ウエル 2 A、2 B、管 3 A、3 B 及び空間 15 を、細胞等の試料に影響を与えない液体で満たすことにより、全体が一定の圧力下に保たれ、管 3 A 又は 3 B から試料を注入・採取する際の水平方向の圧力変化が緩和される。

本発明が提供するウエルユニットは、かかる装置において使用できるウエルユニットも含む。図 5 (2) には、かかる装置において使用できる本発明のウエルユニットの一例が示されており、ウエル 2 A には、管 3 A を設けるための貫通孔 3 A a が、ウエル 2 B には、管 3 B を設けるための貫通孔 3 B a が、夫々、設けられている。

図 5 に示す装置の応用例として、図 6 (1) に示すように、各ウエル 2 A、2 B に管 3 A・3 B、及び連通管 4 A・4 B を設け、各管の上端部に、液体を入れるための空間 15 を設けることができる。この場合に用いられる本発明のウエルユニットは、図 6 (2) に示すように、各ウエルに二個ずつの貫通孔が設けられる。なお、図 6 には、流路 1 おける土手 10 に障壁が設けられていないウエルユニットの使用例を示してある。

本発明のウエルユニットにおいては、複数のウエルを目的に応じて種々の様式で結合させ、互いに連通させることが可能である。本発明は、複数のウエル 2 が、種々の様式で、流路 1 を介して結合し互いに連通した構造のウエルユニットを含む(図 7 ～ 図 14 参照)。

また、本発明は、できるだけ少量の細胞を用いて走化

性を調べることができるように、流路に対するウエルの構造を設定する場合を含む(図 15、図 16 参照)。

流路 1 には、細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を 1 乃至複数本、例えば、約 20～約 100 本構成する障壁を設けること好ましい。かかる溝を設けることにより、細胞や検体の拡散状況を調節し、細胞の動きをより正確に、且つ、個々のレベルで観察することが可能となる。更には、溝を設けることは、細胞のウエル内における位置の調節を容易に行うことを可能にする。即ち、ウエルに入れた細胞が、走化開始前に流路の近傍に集まり、細胞の進行方向に向かって並ぶという状態が容易に作り出される。本発明のウエルユニットは、目的に応じて、障壁の種々の構造を採用することができる(図 19～図 25 参照)。

流路 1 には、テラスを設けることができ、テラスの構造を種々変えることにより、流路を通過した細胞、或いは通過する細胞の状況を観察することが容易になる。また、ウエル内における細胞の流路に対する位置関係を調整することが可能となる。本発明は、かかるテラスの構造を有するウエルユニットに関わる(図 26～図 31 参照)。

本発明のウエルユニットは、流路を介するウエルの結合を一つのユニットとする時、複数のユニットを集積させた場合を含む(図 33～図 37 参照)。かかる集積により、一度に多種類の細胞・検体を処理することが可能な細胞走化性検出又は細胞分離装置を組み立てることができる。

本発明のウエルユニットを備えた細胞走化性検出及び

細胞分離装置における、細胞の移動の観察乃至流路を通過中又は通過後の細胞数の計数は、図1、図3、図5或いは図6に示すように、流路1に検知装置、例えば顕微鏡をセットすることにより行われる。また、顕微鏡—ビデオカメラ、或いはCCDカメラを組み合わせることにより、自動的に細胞の移動する経過を記録することが可能となる。

流路1を通過する細胞の検出・計数は、細胞を直接顕微鏡で捉えることにより行うこともできるが、常法に従い、予め細胞を発光・蛍光物質でマーキングしておき、その発光・蛍光を捕捉することにより容易に検出・計数することができる。

本発明によれば、後述するように、装置の全体を小型化することが可能であり、試料の処理を微量で行うことができ、しかも各ユニットを多数集積させて、多数検体の処理を同時に行うことが可能となる。更に、液体の吸引・注入量のプログラム制御により自動化して行うことが容易である。

装置の自動化は、ユニット単体、同一又は複数種のユニットを複数個集積させてなる集積ユニット又は複数の集積ユニットよりなるユニット部と共に、細胞貯蔵部、検体貯蔵部、必要に応じてピペット洗浄部及びこれ等各部を移動する細胞や検体等の試料供給ピペットを備え、且つ、これ等ピペットの作動を制御する機構を備えることにより、細胞や検体等の供給・採取も含めた装置全体を自動制御することができる。更に、複数のユニット上

の流路における細胞の状態を検出するために検出器をスキャンさせ、一定時間毎に繰返し検出し、細胞の動きを経時的にトレースするよう検出器を制御することも可能である。これ等の制御は、コンピュータプログラムにより容易に行われる。

本発明に関わるウエルユニットの構造を更に具体的に説明すれば、次の通りである。

#### 1) ウエルユニットの構造

図2、図4及び図6に例示するように、流路及びウエルは基板7上に一体的に構築されるのが好ましく、基板7には、必要に応じ、各ウエルに通じる管と連絡する穴（貫通孔）が設けられる。流路には土手10が設けられる。土手の上部は、平面であるか、溝5を構成する障壁6及び必要に応じてテラス11が設けられる。

土手10を設けること、或いは土手10に溝5を構成する障壁6を設けることにより、ウエルに入れた細胞が、走化開始前に流路の近傍に集まり、細胞の進行方向に向かって並ぶという状態が容易に作り出される。即ち、ウエルの一つに細胞懸濁液を入れた後、流路を介して反対側にあるウエルから適当量の液体を吸引することにより細胞が流路の近傍に集められる。このとき、土手10又は土手10と障壁6の存在により、細胞は進行方向に対して直交する方向に並ぶ。次いで、反対側のウエルに走化性因子が注入されると、細胞が流路の通過を開始する。流路の近傍に細胞が集まっていない場合、或いは、並んだ状態にないときは、細胞の動きが不規則的になり、所

謂、細胞のランダムムーブメントの故に、走化性の検出を明確に行うことが困難となる。このウエルユニットを用いて、細胞走化性検出及び細胞分離装置を組み立てるには、1) ウエル及び流路を設けた基板7にガラス基板8をのせる(図1参照)、或いは、2) ウエル、流路及び貫通孔を設けた基板7に、貫通孔に相当する管を穿ったブロック9を、各管が基板上の各貫通孔に合致するように固着し、更にガラス基板8を密着固定する(図3、図5、図6参照)。なお、ブロック9、基板7及びガラス基板8はOリングで締め付ける等により圧着・固定してもよい(図39参照)。

## 2) ウエル

ウエル2は、試料、即ち、細胞浮遊液又は走化性因子含有溶液、或いは、同阻害剤含有溶液等の検体溶液を静止した状態で収納する構造を有する。これは、細胞の自力による動きを正確に検出するために必要な構造である。容積は、特に制限は無く、必要最小限の液量を収納できればよい。例えば、液量  $0.3\mu\text{l}$  を収容する場合は、深さ  $0.1\text{mm}$ 、幅  $1.2\text{mm}$ 、長さ  $2.5\text{mm}$  あればよい。

## 3) 流路を介したウエルの連通様式

流路を介したウエルの連通様式は、図2、図4、図5(2)或いは図6(2)に例示する2連式、図7、図8に例示する3連式が通常用いられる。図2及び図7は貫通孔が設けられていない場合であり、図4、図6、図8は貫通孔が設けられている場合の例示である。3連式の場合は、例えば、ウエル2Aに細胞浮遊液、ウエル2Bに阻



害剤含有液、ウエル 2 C 走化性因子含有液を入れることにより、複数検体につき 3 者の関係を一度に調べることができる。

ウエルは、必要に応じて更に結合させ、連通させることができる。連通の形式として、図 7 や図 8 のような直列型の他に、図 9 ～図 11 に例示するように、一つのウエルの周りに流路を介して複数のウエルを連通させた、所謂、同心状の形式をとることもでき、更には、図 12、図 13 の如く、同心円状にすることもできる。図 12、図 13 は、3 連式を同心円状にした例である。

図 9 ～図 11 の場合、中央のウエル 2 A に細胞浮遊液を入れ、ウエル 2 B<sub>1</sub> ～ 4 に種々の検体を入れることにより、複数の走化性因子の検索を同時に行うことができる。更に、複数種の細胞を含む試料をウエル 2 A に入れることにより、細胞を種類別に分離することを一度に行うことができる（ソーティング）。例えば、ウエル 2 B<sub>1</sub> ～ 4 に細胞の種類に対応した走化性因子を入れ、中央のウエル 2 A に複数種の細胞を含む試料、例えば全血を入れる。細胞は、夫々の走化性因子のある各ウエル 2 B<sub>1</sub> ～ 4 に向かって移動する。一定時間経過後に、各ウエル 2 B<sub>1</sub> ～ 4 から細胞を採取する。

図 14 には、1 つのウエル (2 A) に流路を介して連通している複数のウエルの内、少なくとも 2 つのウエル (2 B<sub>1</sub> 及び 2 B<sub>2</sub>) が相互に流路を介して更に他の共通のウエル (2 C) と連通しているタイプが例示されている。この場合、ウエル 2 A に細胞浮遊液を、ウエル 2 C に走

化性因子を含有する検体溶液を入れ、ウエル 2 B<sub>1</sub> 及び 2 B<sub>2</sub> に夫々異なった阻害剤を含む検体溶液を入れることにより、夫々の阻害剤の性質を同一条件下で比較しながら調べることができる。

#### 4) ウエルの構造における特定の態様

流路を介して互いに連通しているウエルの何れか一方、例えば細胞を収納するウエル、又は双方において、流路の近傍における液体又は細胞懸濁液の量を制限するべく、流路に直交して壁を設けることにより、ウエル内における細胞の流路に対する位置関係を調整することが容易となり、或いは、検体試料の流れを調整することが容易となる(図 15)。図 15 は、流路 1 を介してウエル 2 A、2 B が連通しており、夫々のウエルに、流路 1 に直交して壁 14 A 及び 14 B が設けられている場合を示す。試料注入管 3 A からウエル 2 A に細胞を注入すると、一定量の細胞が壁 14 A と流路 1 の間に集まる。壁 14 と流路 1 との間隔は任意に設定できるが、通常は 50~300  $\mu$  m から選ばれる。

図 16 は、流路に直交して壁を設けたウエルと流路の変形例を示しており、(1)はウエルの幅の一部に流路が設けられている場合を、(2)は流路が中央で二分されており、流路を挟んで一個のウエル(2 A)に対し二個のウエル(2 B、2 C)が設けられていると共にウエル 2 A 側にのみ壁 14 A が設けられている場合を、(3)は流路において障壁の列がテラス 11 を挟んで二列設けられている場合を、夫々示している。このような変形は例示と

して挙げたもので、これ等に限られないことは言うまでもない。

#### 5) 流路

流路 1 (図 3、5、6、8~16) の構造の一例を図 1 ~ 6、図 17、18 により説明すれば次の通りである。流路 1 は、両端のウエル 2 A とウエル 2 B を隔てる土手 10 (基板 7 上の突出部) とガラス基板 8 との間で細胞が通過する空間を形成する。土手 10 の上部は平面であるか (図 6 参照)、又は、溝 5 を構成する障壁 6 及び必要に応じ、テラス 11 が設けられる。なお、図 17 は、図 1 に示す構造の装置における例であり、図 18 は図 3 や図 5 に示す構造の装置における例である。

土手 10 は、流路 1 の両端にあるウエル 2 A、2 B を隔てるもので、そのサイズは、特に限定されるものではないが、例えば、高さ 0.03~0.1mm 程度、相対するウエルに向かう方向における長さとして 0.01~0.5 mm 程度あればよく、相対するウエルに向かう方向に直交する方向における長さは、ウエルの幅又はそれ以下でよい。

土手の上部に溝を構成する障壁を設けない場合は、土手の上面がガラス基板との間で細胞の径又は細胞の変形能に合わせた深さ乃至隙間を形成する。この場合の深さは、細胞の種類に合わせて、通常 3~50  $\mu\text{m}$  から選ばれる。好中球、好酸球、好塩基球、単球・マクロファージ、T 細胞、B 細胞等の場合は 3~10  $\mu\text{m}$ 、例えば 6、7、8 又は 10  $\mu\text{m}$  から選ばれ、がん細胞や組織に存在する細胞の場合は 10~20  $\mu\text{m}$  の幅が選ばれる。

## 6) 流路における障壁及び障壁により構成される溝

土手 10 の上面には、図 19 で示すように、障壁 6 を設けることができる。障壁 6 により構成される溝 5 の断面は、V 字型断面、凹型断面、半円型断面等、任意の形状とすることができる(図 20 参照)。

溝 5 の幅は、通常は  $3 \sim 50 \mu\text{m}$  から選ばれ、対象とする細胞が 1 個ずつ通過するだけの幅であることが好ましく、細胞の種類に合わせて好適な幅が選ばれる。好中球、好酸球、好塩基球、単球・マクロファージ、T 細胞、B 細胞等の場合は  $3 \sim 10 \mu\text{m}$ 、例えば 6、7、8 又は  $10 \mu\text{m}$  から選ばれ、がん細胞や組織に存在する細胞の場合は  $10 \sim 20 \mu\text{m}$  の幅が選ばれる。

溝 5 の深さ(障壁 6 の高さ)は、顕微鏡の焦点深度に合わせて適宜設定するか、或いは、細胞が 1 個ずつ通過し得る深さとすることができる。更には、溝の幅と溝の高さの双方を細胞が 1 個ずつ通過し得る幅と高さに設定しても良い。

溝 5 の深さを、細胞の移動を観察する際の顕微鏡の焦点深度内に収まる深さにする場合、例えば、 $10 \sim 40$  倍の顕微鏡の焦点深度に合わせる場合は  $4.5 \mu\text{m}$  程度が好ましいが、これに限定される必要はない。

溝 5 の数は、流路の幅に対する障壁の幅と溝の幅で決定される。例えば、流路の幅  $1 \text{ mm}$ 、障壁の幅  $10 \mu\text{m}$ 、溝の幅  $5 \mu\text{m}$  の場合、溝の数は最大で 66 本となる。検出・観察に適した溝 5 の数は、1 乃至約 100 本、好ましくは好ましくは約 10 乃至約 70 本である。

障壁 6 の長さは、約 5 ～ 約 400  $\mu$  m から選ばれ、例えば、5、10、20、30、40、60、100、200、300 又は 400  $\mu$  m のものが用いられる。障壁 6 自体の幅は適宜選ぶことができる。後述する図 25 に示す構造を採る場合は縦横の長さがほぼ等しい方が効果的である。

流路 1 を形成する溝 5 は、図 21、図 22 に例示するごとく、相対するウエルに向かう方向に直交する 1 乃至複数本の溝 12 で互いに連通していてもよい。かくすることにより細胞が通過する様子をより正確に把握することができる。その場合、図 23、図 24 の如く溝 5 の幅を、相対するウエルに向かう方向でこれに直交する溝 12 を横切る度に段階的に変化させても良い。なお、図 23 では、障壁 6 自体の幅が変化する例を示しているが、図 24 に示すように、同一の大きさを有する障壁 6 の数を増減させることにより溝 5 の幅を変化させることもできる。

図 25 に例示する如く、相対するウエルに向かう方向の複数の溝 5 が、これに直交する溝 12 を横切る度に、相互の位置関係をシフトさせて形成されていてもよい。図 25 は、相対するウエルに向かう方向の溝 5 が、それと直交する溝 12 を横切る毎に、5 a と 5 b のように、2 分の 1 ピッチずつ位置関係を変えて形成されている場合を示す。溝 5 をこのように形成させることにより、走化性因子や阻害物質を含有する検体溶液の拡散を充分に行わせることができ、相対する流路に向かう方向での検体溶液を均一に分布させることができると共に、細胞や検

体の注入・採取による昇圧・減圧をより効率よく回避することが可能となる。

更に、障壁 6 は、図 26 に例示する如く相対するウェルに向かう方向に繋がった連続形であっても良い。

#### 7) 流路における、画像の位置決めのための印

流路を通過する細胞の状態を検出するに当たり、検出器 13 が一定時間経過毎に所定の流路上に戻り、繰返し検出を行う場合がある。例えば、後述するように、複数のウェルユニットを集積させた装置において、各ウェルユニットの流路を通過する細胞の状態を検出するために、検出器 13 をスキャンさせ、経時的に検出を行う場合である。このような場合、所定の流路においては検出画面の範囲が毎回同じになるよう、画面の位置決めに容易にするために、流路上の何れかの位置に印を設けると便利である。印は位置決めに容易にするために役立てば、如何なる形状でも良い。また、印を設ける箇所は、土手 10 の上部、例えば後述のテラス 11 の何れかの箇所、或いは、何れかの障壁の上部であっても良い。また、設ける印の数は、1 個に限らず、複数個であっても良い(図 27、図 28(1)参照)。

#### 8) 流路におけるテラス

土手の上面に、例えば図 1、図 2 において符号 11 で示す平面を設けると細胞の通過が観察しやすくなる(この平面をテラスと呼ぶことにする)。テラス 11 は必須のものではないが、設けることが好ましい。図 2 に示すように、テラス 11 を障壁 6 の列の両側に設ける場合、そ

の相対するウエルに向かう方向の長さは約 0.03 m m 乃至約 0.4 m m から適宜選ばれる。また、図 27 に例示するように、障壁 6 の列の両側に設けられたテラス 11<sub>-1</sub>、11<sub>-2</sub> の内、一方(図 27 では、11<sub>-1</sub>)を他方(図 27 では、11<sub>-2</sub>)より長くすることもできる。かかる構造とすることにより、溝を通過した後の細胞の観察が容易になる。

なお、図 27 には、土手上面に+印(23)が設けられた例が示されているが、この印は必要に応じて設けられればよい。

土手の中央にテラスを設け、テラスをはさんで 障壁の列を 2 箇所形成することもでき(図 28 参照)、かかる構造とすることにより、溝を通過した後の細胞が中央のテラス上に存在する時間が長くなり、観察・計数が容易に行われる。なお、中央のテラスの大きさは、顕微鏡の視野でカバーできる大きさであることが望ましい。図 28 において、(1)は上面図、(2)は断面図である。

図 28 には、画像の位置決めを容易にするための印(23)が 2 箇所に設けられている場合が例示されているが、この印は必要に応じて設けられれば良い。

図 29～図 31 は、図 15、図 16 に示すタイプのウエルにおいて、流路にテラスを設けた例である。なお、図 29～図 31 の(1)は上面図、(2)は、(1)における破線で示した部分の断面図である。図 29 は流路を挟んで両側に、流路に直交する壁 14 A、14 B までテラス 11 A、11 B が設けられている場合を示す。図 30 は流路の片側においてのみ、流路に直交する壁 14 A ま

でテラス 1 1 A が設けられ、反対側においては壁 1 4 B に達しないテラス 1 1 B が設けられている場合を示す。

図 31 は、細胞が注入されるウエル 2 A 側にのみ流路に直交する壁 1 4 A が設けられている場合において、該壁 1 4 A までテラス 1 1 A が設けられている場合である。

図 15、図 16 に示すタイプのウエルにおいて、かかるテラスを設けることにより、ウエル 2 B 側に入れた走化性因子や阻害物質がウエル 2 A 側へと溝を通り抜けた後に、それ等の拡散が急激に進むのを防止することができる。かかるテラスがない場合は、流路の近傍の容積が大きいため、拡散が急激に進むことになる。

なお、図 32 に例示するように、土手 10 を多段に形成すること、即ち、土手 10 のテラス 11 を多段式に形成することにより、一方のウエル側から吸引すると他方のウエルに入れた細胞が土手 10 の近傍に集まり易くなる。例えば、細胞が好中球、好酸球、好塩基球等である場合、テラス 11<sub>-2</sub> 及び 11<sub>-3</sub> のガラス基板 8 からの距離（図においては障壁 6 の高さ）を 3  $\mu$ m、テラス 11<sub>-1</sub> 及び 11<sub>-4</sub> のガラス基板 8 からの距離を 4.5  $\mu$ m とし、ウエル 2 A に細胞を入れ、ウエル 2 B の側から液を吸引すると、細胞はテラス 11<sub>-1</sub> のところで一旦止まった後、テラス 11<sub>-2</sub> とガラス基板 8 との間に集まり易くなる。各テラス 11<sub>-1</sub>~<sub>4</sub> のガラス基板 8 からの距離は、取扱う細胞に応じて適宜設定することができ、概ね 3 乃至 5  $\mu$ m の範囲で設定され得るが、これに限定されるわけではない。ここで、細胞を収納するウエルの反対側のテラス（11<sub>-</sub>



3) の長さを、細胞を収納するウエルの側のテラス（テラス 11-2）より約 1.5 乃至 5 倍長くすると、溝を通り抜けた細胞の観察や計数をより容易に行うことができる。

#### 9) 流路における障害物

走化性因子を入れる前に、他方のウエルにおいて細胞が同じ条件で、細胞の進行方向に向かってスタートラインに並ぶようにするための構造の一つとして、流路に細胞の移動を制限するための障害物を設けることが提案される。

ここに云う障害物とは、細胞の移動を完全には遮断することなく、その移動を制限するもので、例えば、一連の突起の並び、一連の三角柱や四角柱の並びを挙げることができるが、この目的を達成し得るならば如何なる形状でも採用し得る。障害物が設けられる位置は、土手の上部であることが好ましいが、目的を達成するのであれば、土手の上部に限られない。土手の上面に障壁が設けられておらず、全面がテラスである場合はその一端付近に設けられる（図 40(1)参照）。土手の上面に障壁とテラスが設けられている場合は、障壁の列に並行して、テラスのウエル側に設けられる（図 40(2)～(4)参照）。

なお、図 40 において、(1)、(2)及び(4)は障害物として突起の並びが採用された場合の例示であり、(3)は三角柱の並びが採用された場合の例示である。

障害物の高さは、細胞の径又は変形能に合わせた長さと同様かその 2 分の 1 乃至 4 分の 1 あればよい。障害物の間隔は、通常は、細胞の径又は変形能に合わせた長

さと同等に設定されるが、高さが低く設定されている場合は、それより短く設定されていてもよい。

#### 10) 多数のユニットの配列

流路を介して連通した複数のウエルを1ユニットとして、複数のユニットを1枚の基板上に配置乃至集積して多数検体を同時に処理するウエルユニットとすることができ、同じタイプのユニットを並列に配置する場合(例えば図 33~35)、円形に集積する場合(例えば図 36)、異種のユニットを配列する場合(例えば図 37)等、必要に応じて種々の配置乃至集積をすることが可能である。以下に各図に基づいて配置乃至集積の様式を説明するが、もとよりこれ等は例示であり、これ等に限定されるものではなく、目的に応じて種々の組み合わせを採ることができる。

図 33 及び図 34 は、図 3 に示す、2つのウエルが流路を介して連通してなるウエルユニットが、1辺が 16 mm の正方形である一枚の基板 7 上に 12 個設けられた場合を示す。1ユニットの大きさは長辺が 5.7 mm、短辺が 1.2 mm、ユニットの間隔は 0.8 mm で配置されている。なお、図 33 では、基板 7 に設けられた貫通孔 3 a 及び 4 a が四角形であるのに対し、図 34 は貫通孔が円形である場合を示す。

図 35 は、図 15 に示すタイプのユニットウエルを一枚の基板 7 上に 12 個設けた場合を示す。

図 36 は、2 連式の独立したウエルユニットが円形に集積されている場合を示す。図 36 は各ウエルが貫通孔

を有する場合を示しているが、貫通孔を有さない場合も有り得ることは云うまでもない。大きさを例示すると、ウエル 2 A 及び 2 B は半径方向の幅が 1.5 mm、流路の幅は 0.5 mm であり、10  $\mu$  m 幅の溝 5 が設けられている。この場合、ユニット全体としての円の半径は 5.0 mm である。勿論、目的に応じて大きさを変えることができる。

図 37 は、図 33～図 36 に示される多数ユニットの集積を更に集積させた場合を示す。即ち、図 37 において A<sub>1</sub>～4、B<sub>1</sub>～4、C<sub>1</sub>～4、D<sub>1</sub>～4 で表される四辺形の夫々が図 33～図 36 で示されるウエルユニットの集積である。ここで、A 行、B 行、C 行及び D 行は互いに異なったタイプのユニットの集積であることができる。

これら、多数のユニットを集積させる場合において、ブロック 9 は全てのユニットに夫々管を接続する 1 個のものとして構成することができ、ガラス基板 8 も全体で 1 枚とすることができる。

#### 11) ウエルと流路の作製

基板 7 の材質としては、微細加工が容易で、細胞に対し比較的不活性なシリコン単結晶が好ましい。流路 1 における障壁 6 及び溝 5 は、このシリコン単結晶に集積回路の製作で使用するフォトリソグラフィやエッチング、例えば、ウェットエッチング、ドライエッチング等により工作される。ウエル 2 及び貫通孔 3 a、4 a は障壁 6 や溝 5 に比べれば比較的大きいので様々な既知の工作技術を適用して作製することができ、例えば、サンドトラ

スト法やドライエッチング法を適用することができる。シリコン単結晶以外にも、硬質ガラス、硬質プラスチック、金属等も流路における微細な構造が構築可能であれば使用できる。プラスチックを使用する場合は、表面に親水性を付与するための処理、例えば、表面に親水性薄膜を形成させる処理を行うことが好ましい。なお、流路 1 とウエル 2 を夫々別に作製し、組合わせてもよい。

ウエットエッチングによる製作過程の一例を図 38 により説明すると、まず、シリコン単結晶基板の一部 (1) に、(2) 及び (3) に示す如く、溝 5 を形成させる。ここで、(2) は上面図であり、(3) は破線部における断面図である。次いで、溝 5 及び障壁 6 を残して全体を障壁の高さ (例えば、 $4.5 \mu\text{m}$ ) だけ掘り下げる (4)。その後、中央に土手 10 を残して、更に掘り下げてウエル 2 A、2 B を形成させ (5)、必要に応じ、サンドプラスト法等により、ウエルの底部に貫通孔 3 a、4 a を設ける (6)。(7) は、(6) の上面図である。同様にして、ウエルユニットを集積させた基板も製作することができる。

## 12) 細胞走化性検出及び細胞分離装置の組立て

本発明のウエルユニットを用いた細胞走化性検出及び細胞分離装置の組み立ては、図 1 のタイプの装置においては、基板 7 とガラス基板 8 とを組み合わせることにより行うことができ、図 3 及び 5 のタイプの装置においては、基板 7、ガラス基板 8 及びブロック 9 を組み合わせることにより行うことができる。

ブロック 9 は図 3、図 5 や図 6 に例示するように、ウエルに通じる管を有する部分である。物理的に可能であれば、ウエルの貫通孔 3 a 或いは 4 a に管を直接装着してもよく、その場合は、ブロックは必要でない。管 3、4 の断面は、通常は四角形又は円形から選ばれる。管の太さは、特に限定されるものではないが、四角形の場合は 1 辺が 1 m m 程度でよく、円形の場合は直径が 1 m m 程度でよい。長さは、細胞浮遊液、検体溶液の容量を保持する上から、2 m m ～ 1 0 m m 程度は必要である。

ブロック又は管を構成する材質は、ガラス、アクリル等のプラスチック又は金属から選ぶことができ、ブロックや管は、通常の工作手段、例えば、機械による鑿孔、レーザー光線による鑿孔その他により容易に作製される。また、光重合樹脂に光照射し、感光した部位を残し、感光しない部位を溶媒により溶解除去する方法により、工作することもできる。

ガラス基板 8 は、図 1、図 3、図 5、図 6 に例示するように、基板 7 に圧着して液体を収納する空間を構成し、且つ流路を通過する細胞の観察を可能とするもので、光学的に透明且つ平面性を保持しするものである。また、細胞が接着することが望ましい。かかる目的に適うものであれば、ガラス以外にも、透明アクリル等のプラスチックも使用できる。厚さは、特に限定されるものではないが、1 ～ 2 m m あれば充分である。

図 39 は、本発明のウエルユニットを用いて細胞走化性検出及び走化細胞分離装置を組立てる場合の一例を示

す。カバーキャップ 17 と中間支持体 21 の間にウエルユニットが形成された基板 7、パッキング 16 とそれをカバーする 1 個のブロック 9 をおき、中間支持体 21 と底支持体 22 の間に 1 枚のガラス基板 8 をおき、ネジで締め付ける。ブロック 9 と基板 7 との位置関係は中間支持体 21 で規定され、中間支持体 21 に設けられたガイドピン 20 とブロック 9 の底面に設けられたガイドピン受孔 19 によって固定される。なお、基板 7 とブロック 9 とは直接圧着させてもよい。

### 13) 検出手段

本発明において用いられる検出手段は、流路を移動する細胞又は移動した後の細胞を検出する手段であり、必要に応じ検出結果を記録するための手段を含む。細胞を検出・記録するために知られている手段であれば何れも使用可能であり、例えば、顕微鏡、顕微鏡とビデオカメラの組合せ等である。対物レンズに CCD カメラを取り付けた構造を採用することもできる。集積ユニットの検出においては、対物レンズが各ユニットの流路を順次スキャンする構造を採用することが好ましい。

検出手段は、通常は、図 1、図 3、図 5 や図 6 に示すように、ユニットの流路に設定されるが、多数ユニットを集積させた装置においては、所定の位置に設置された検出器に各ユニットの列が順次移動し、検出・記録を行う構造を採ることもできる。その場合、検出は、直線上に並んでいる各ユニットの流路を検出器がスキャンすることにより行われる。その場合、検出器が各流路を一定

時間毎に繰返し検出し、経時的に細胞の動きを捉えることも可能である。スキャンする検出器は1個でも良いし、複数個でもよい。かくすることにより、比較的少ない数の検出装置で多数の集積ユニットに対応することが可能となる。

流路を通過中、または、通過後の細胞の検出・計数は、細胞を直接顕微鏡やCCDカメラ、CCDビデオ等で捉えることにより行うこともできるが、常法に従い、予め細胞を発光・蛍光物質でマーキングしておき、その発光・蛍光を捕捉することにより容易に検出・計数することができる。

#### 産業上の利用可能性

本発明のウエルユニットを用いることにより、種々の目的に適した細胞走化性検出及び細胞分離装置を組み立てることができる。例えば、試料注入時に水平方向の圧力の変化（昇圧）が生じにくく、外圧による検体や細胞の移動が起こりにくい、細胞の自力による運動を正確に捉えることができる装置を得ることができ、走化性因子又は阻害剤の作用と細胞の性質を忠実に反映させた定量及び定性結果を得ることができる。

また、ボイデンチェンバーでは細胞のランダムムーブメントも捕捉されるため、走化性因子なしのバックグラウンドが高いのに対し、本発明のウエルユニットを用いる装置ではバックグラウンドをほぼゼロにすることができ、定量性も高い。

本発明のウエルユニットは、微量の試料を取り扱うことに適している。即ち、使用する細胞の量を、従来使用されてきたボイデンチェンバーに比べ、10分の1乃至1000分の1とすることが可能である。例えば、試料として全血を使用したとき、好中球の走化性を検出する場合は $0.1\mu\text{l}$ の血液でよく、好酸球、単球又は好塩基球では $1\mu\text{l}$ 程度の血液で測定可能である。

更に、本発明のウエルユニットは微小なものとすることができるため、多数集積させることが可能であり、多数の試料を同時に処理する装置を組み立てることができ、且つ、装置の自動化が容易に行えるというメリットがある。

本発明のウエルユニットは、複数種の細胞を含む細胞浮遊液から、特定の細胞のみを移動させた後、これをウエルから採取するのに適しており、目的の細胞を的確に採取することができる。

本発明のウエルユニットは、流路1に土手を設けること、更には、土手に細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝5を種種の態様で設けること、或いは、土手に細胞の径又はその変形能に合わせた深さを形成する平面を設けることにより、細胞の個々の動きをより容易に捉えることが可能となる。また、土手を設けること、或いは土手に溝を構成する障壁を設けることにより、ウエルに入れた細胞が、走化開始前に流路の近傍に集まり、細胞の進行方向に向かって並ぶという状態が容易に作り出される。このことは、細胞の走化性を検出



する際の正確性を高める。

本発明のウエルユニットによれば、複数種の細胞を含む試料、例えば、全血を用いて、その中に含まれる種々の血球の一部について、これを予め分離することなく、走化性を調べることができ、又、走化性因子を適当に選ぶことにより、複数種の細胞を含む試料から細胞を種類ごとに分離することができる。

## 請 求 の 範 囲

1. 液体試料を静止した状態で収納できるウエルの複数個が流路を介して互いに連通していること、流路には土手が設けられていること、ウエルはガラス基板と密着するように形成されていること、土手の上部には細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する障壁が設けられているか、又は平面が設けられており、該平面はガラス基板との間で細胞の径又はその変形能に合わせた隙間を形成するべく設けられていることを特徴とする細胞走化性検出及び細胞分離装置のためのウエルユニット。

2. 液体試料を静止した状態で収納できるウエルの複数個が流路を介して互いに連通していること、流路には土手が設けられていること、土手の上部には細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する障壁が設けられていることを特徴とする請求項1記載のウエルユニット。

3. 複数のウエルが流路を介して直列に連通していることを特徴とする請求項1記載のウエルユニット。

4. 1つのウエルに複数のウエルが流路を介して連通していることを特徴とする請求項1記載のウエルユニット。

5. 1つのウエルに流路を介して連通している複数のウエルの内、少なくとも2つのウエルが流路を介して更に他の共通のウエルと連通していることを特徴とする請

求項 4 記載のウエルユニット。

6. 複数のウエルが、細胞浮遊液を収納するウエル及び走化性因子を含有する溶液を収納するウエルであることを特徴とする請求項 1 記載のウエルユニット。

7. 複数のウエルが、細胞浮遊液を収納するウエル、走化性因子を含有する溶液を収納するウエル及び走化性因子阻害剤を含有する溶液を収納するウエルであることを特徴とする請求項 1 記載のウエルユニット。

8. 流路を介して互いに連通しているウエルの何れか一方又は双方において、流路の近傍における液体の量を制限するために、流路に直交して壁を設けることを特徴とする請求項 1 記載のウエルユニット。

9. 請求項 8 記載のウエルユニットにおいて、流路に直交して設けられている何れか一方又は双方の壁のまでテラスが形成されていることを特徴とするウエルユニット。

10. 土手の上部の何れかの箇所に、細胞を検出する画面の位置決めを行うための印を設けることを特徴とする請求項 1 記載のウエルユニット。

11. 流路において、土手が多段に形成されていることを特徴とする請求項 1 記載のウエルユニット。

12. 流路に設けられている溝が、相対するウエルに向かう方向に直交する 1 乃至複数本の溝で互いに連通していることを特徴とする請求項 2 記載のウエルユニット。

13. 流路において、相対するウエルに向かう方向の複数本の溝の幅が、これに直交する 1 乃至複数の溝を横切

る度に段階的に変化することを特徴とする請求項 12 記載のウエルユニット。

14. 流路において、相対するウエルに向かう方向の複数の溝が、これに直交する 1 乃至複数本の溝を横切る度に、相互の位置をシフトさせて形成されていることを特徴とする請求項 12 記載のウエルユニット。

15. 流路において、細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を 1 乃至複数本構成する障壁の一連の列の前後にテラスが設けられており、且つ、細胞の進行方向におけるテラスの長さが他方のテラスの長さより長いことを特徴とする請求項 2 記載のウエルユニット。

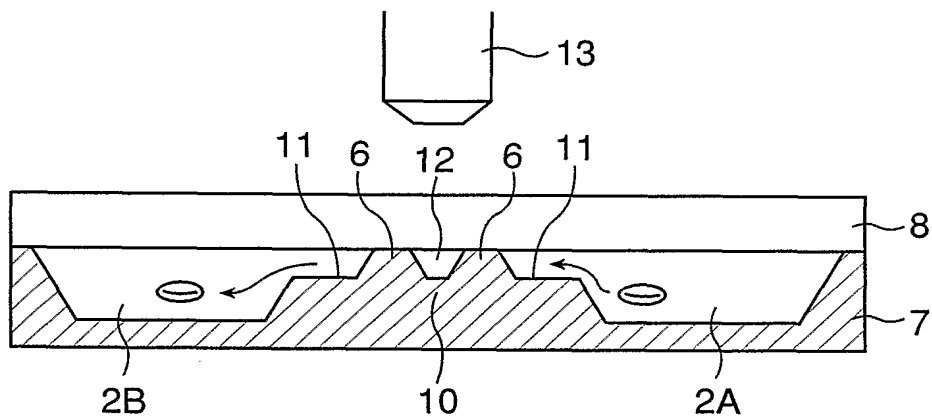
16. 流路において、中央にテラスを設け、細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を 1 乃至複数本構成する障壁の列が該テラスを挟んで 2 箇所形成されており、所望により、障壁の列の外側にもテラスが設けられていることを特徴とする請求項 2 記載のウエルユニット。

17. 土手の上部に、細胞をスタートラインに並べる際に細胞の移動を制限するための障害物を、相対するウエルに向かう方向に直交して設けることを特徴とする請求項 1 記載のウエルユニット。

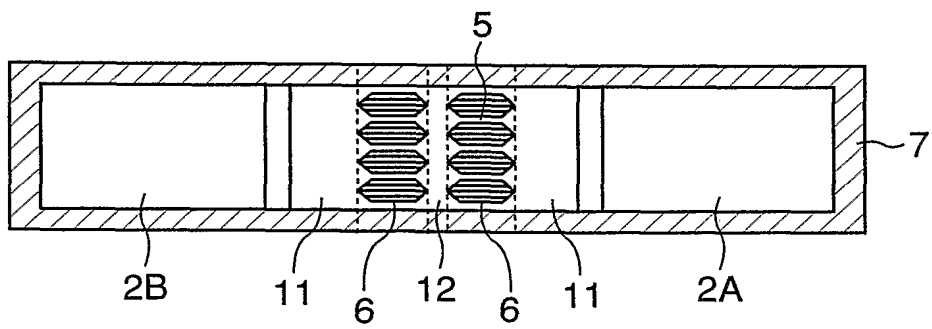
18. 土手の上部に、細胞をスタートラインに並べる際に細胞の移動を制限するための障害物を、障壁の列に並行して設けることを特徴とする請求項 2 記載のウエルユニット。

19. 請求項 1 乃至 18 記載のウェルユニットの夫々を 1 ユニットとし、同一又は複数種のユニットを複数個集積してなることを特徴とする細胞走化性検出及び細胞分離装置のためのウェルユニット。

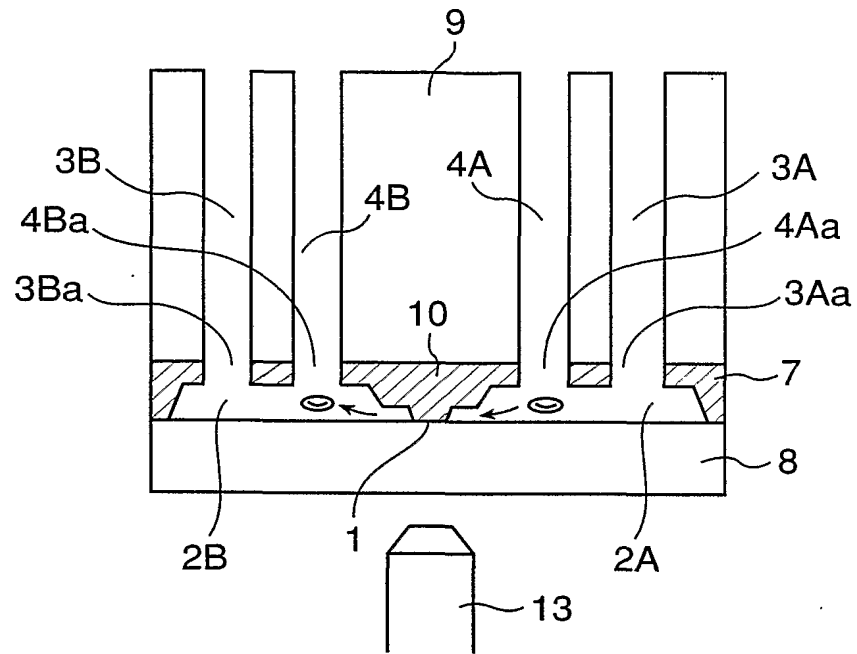
F i g .1



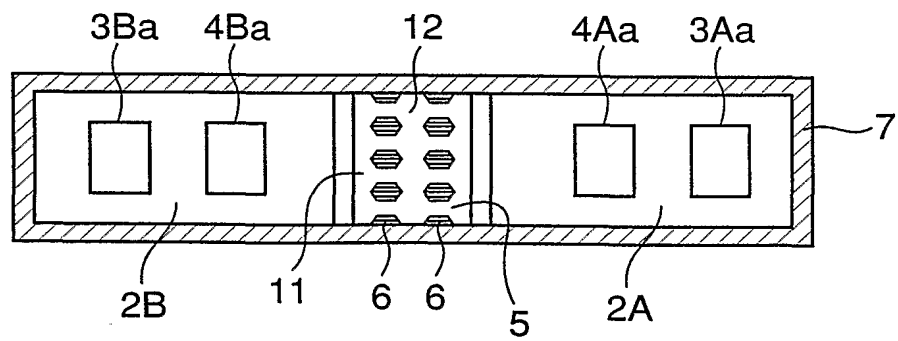
F i g .2



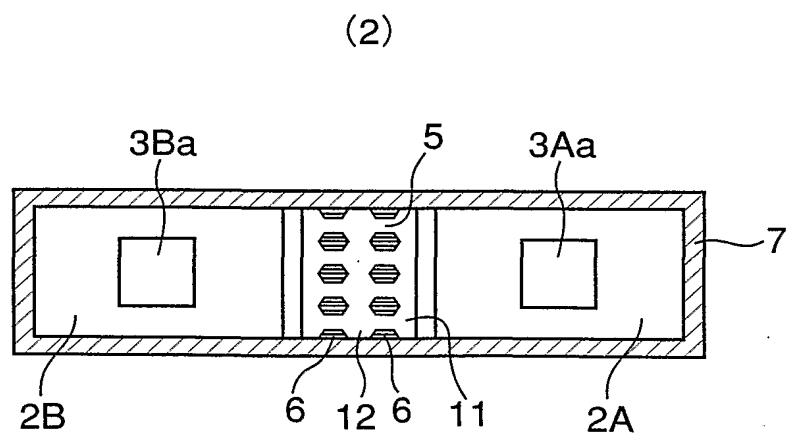
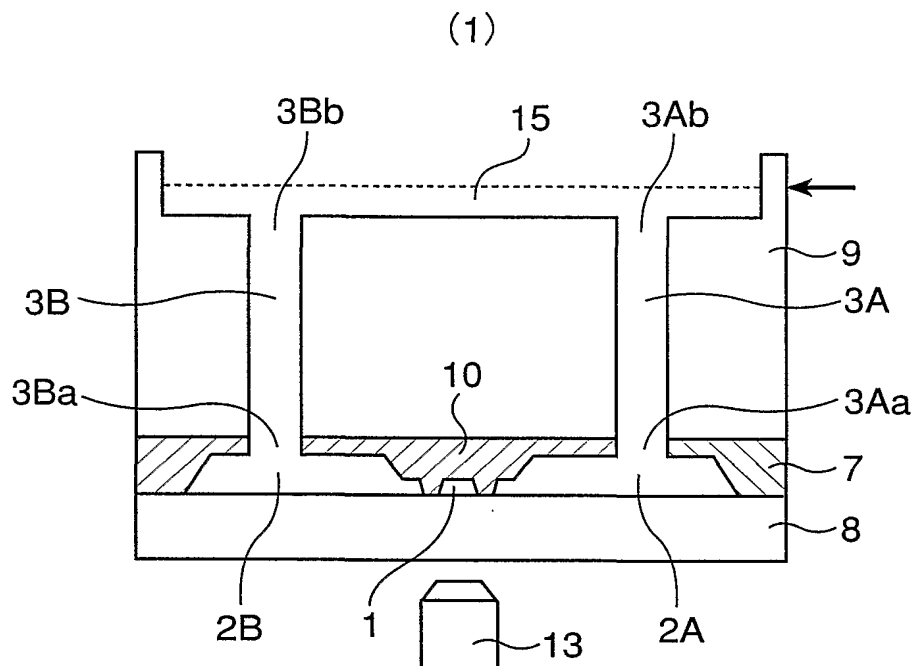
F i g .3



F i g .4



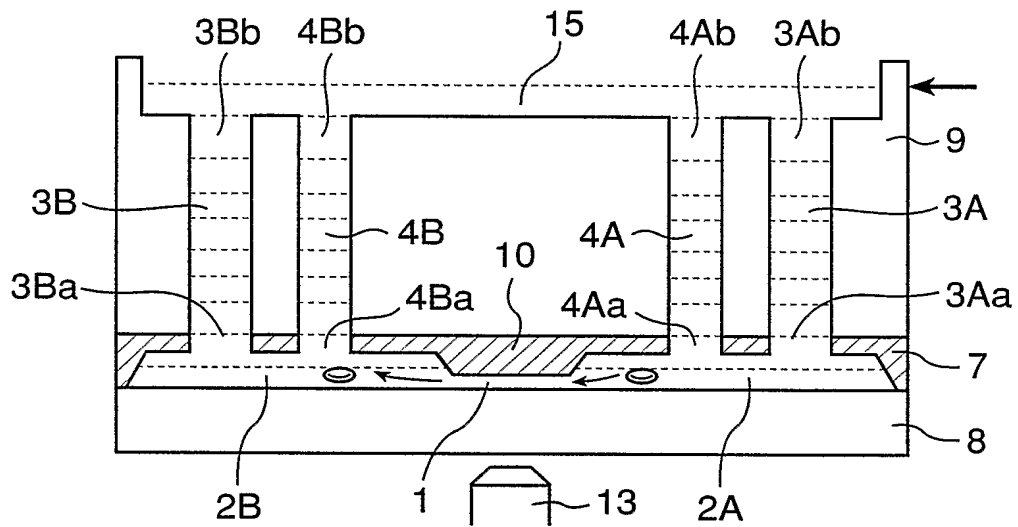
F i g .5



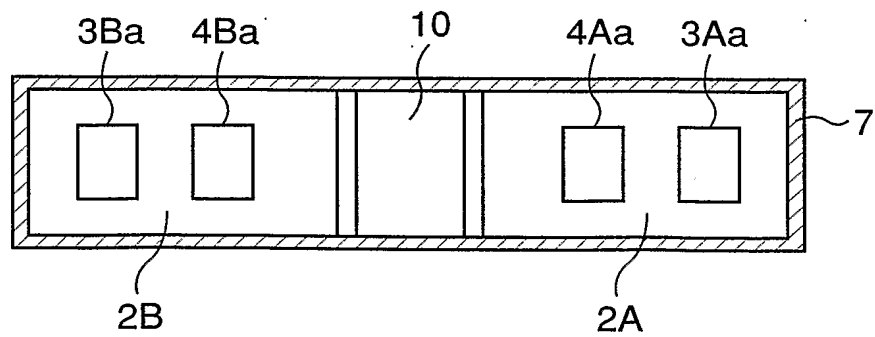


F i g .6

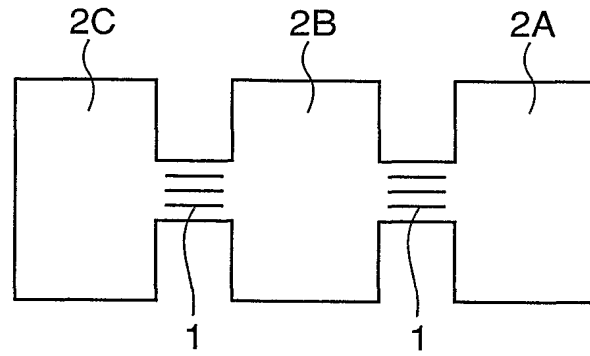
(1)



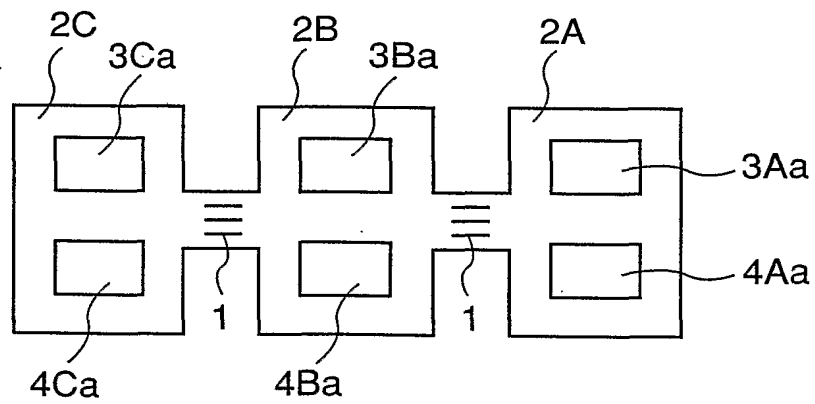
(2)



F i g .7

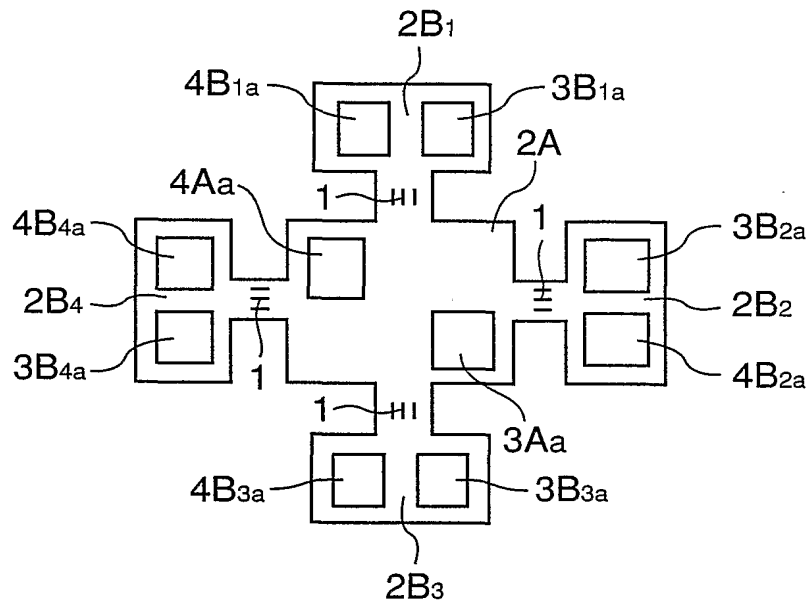


F i g .8

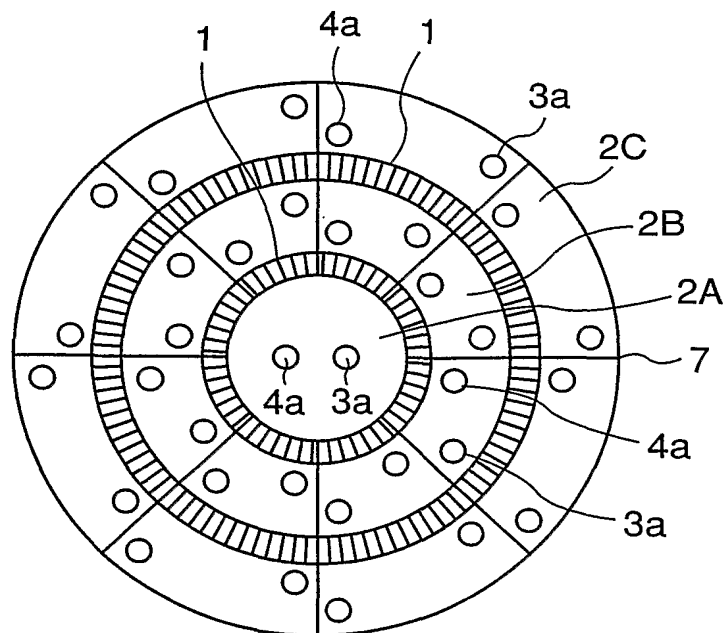




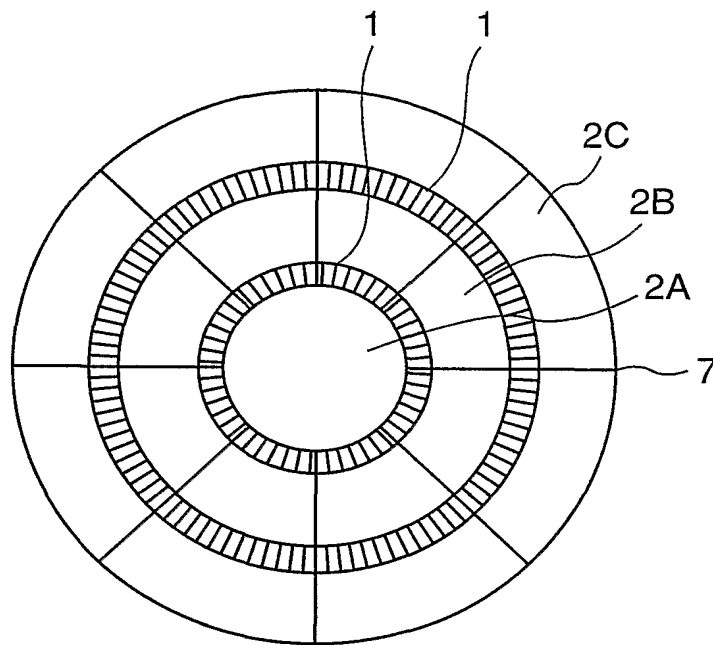
F i g . 1 1



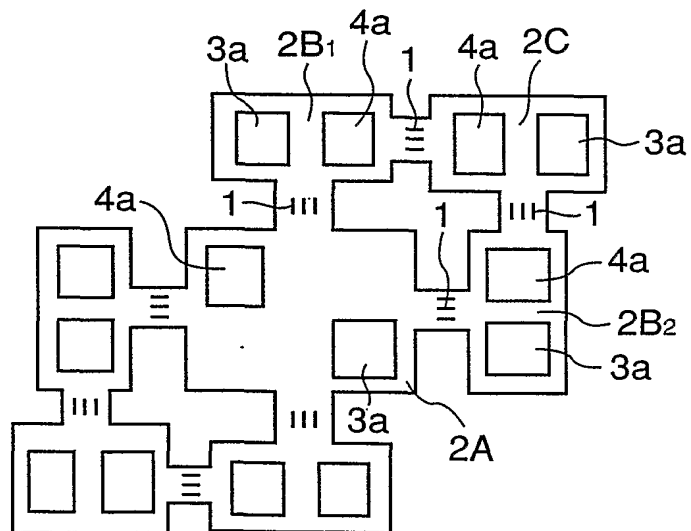
F i g .12



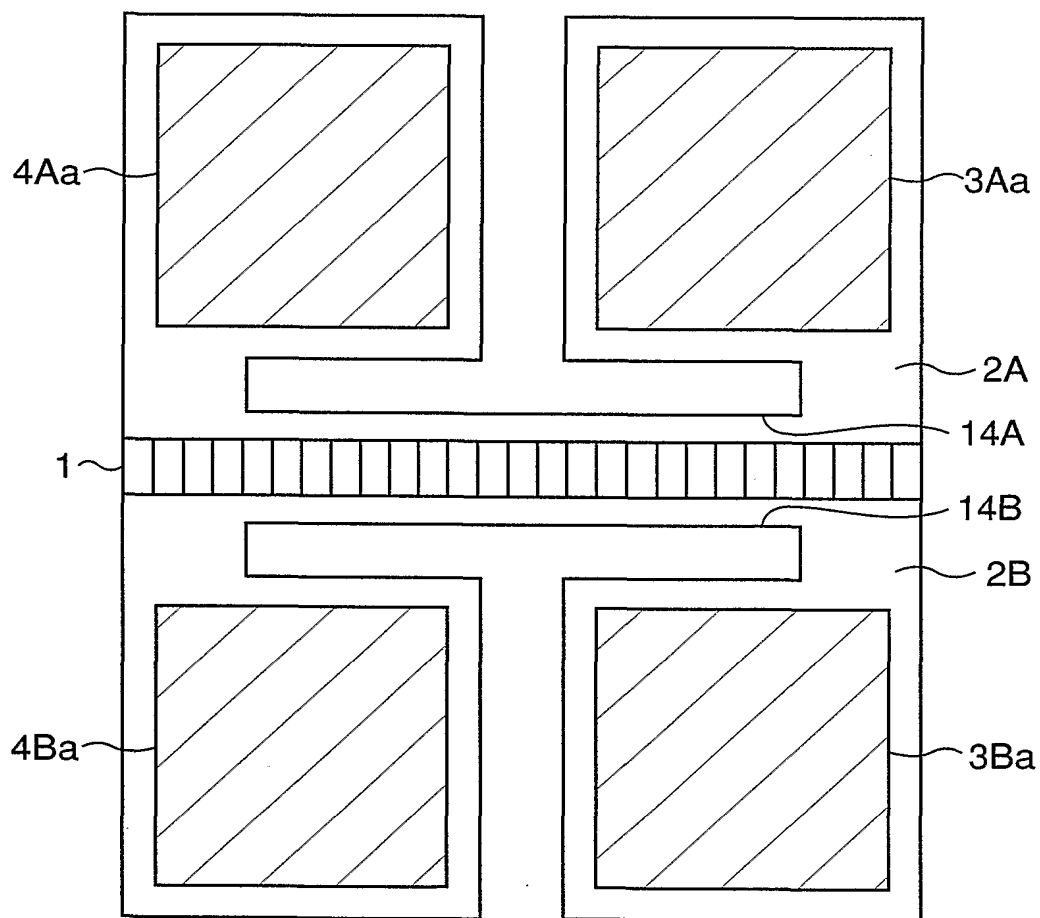
F i g.13



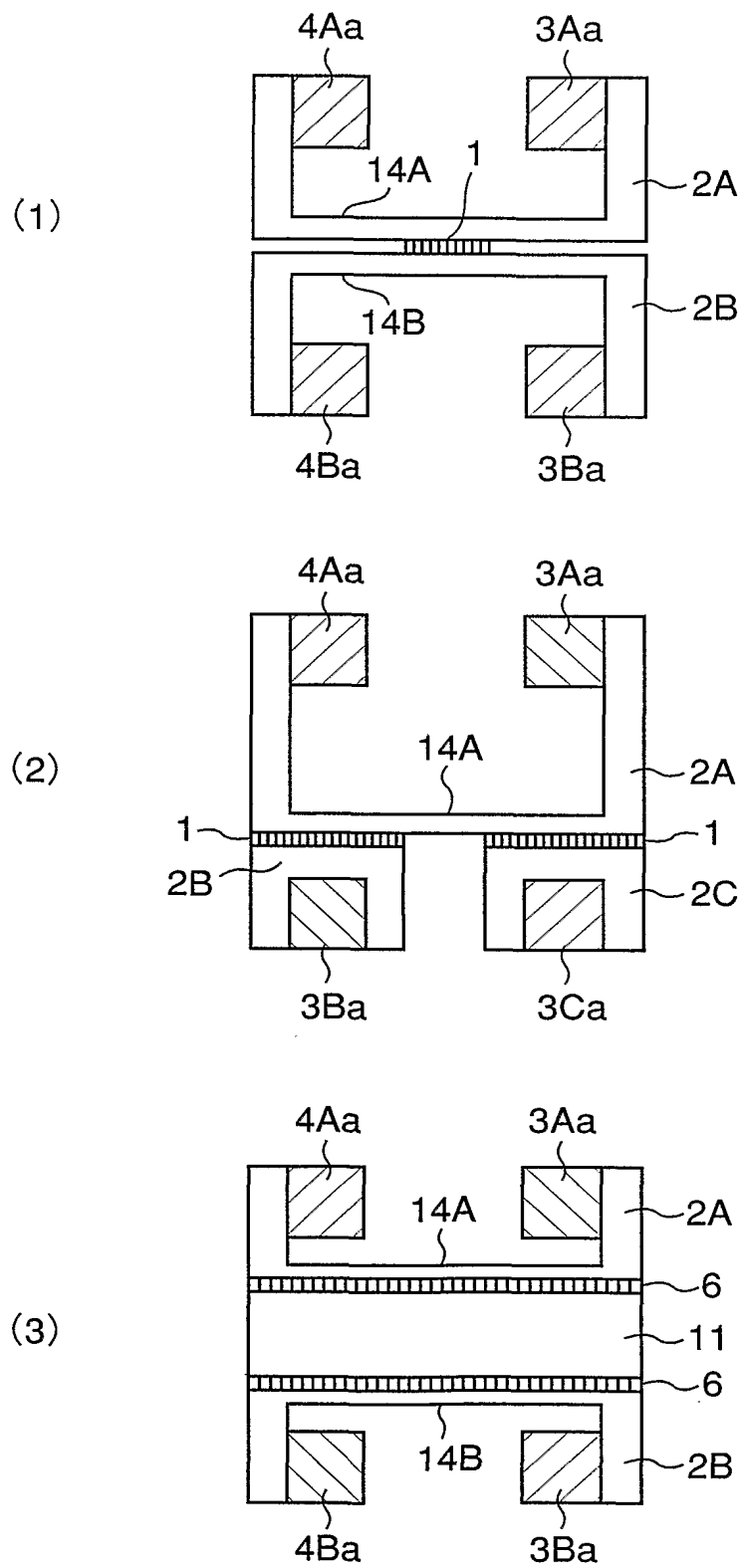
F i g.14



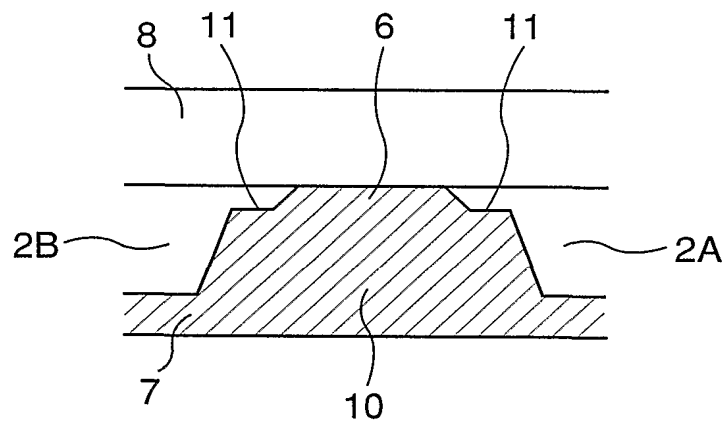
F i g .15



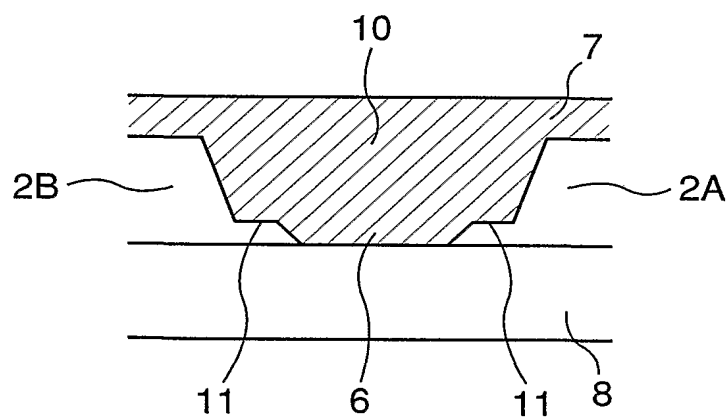
F i g .16



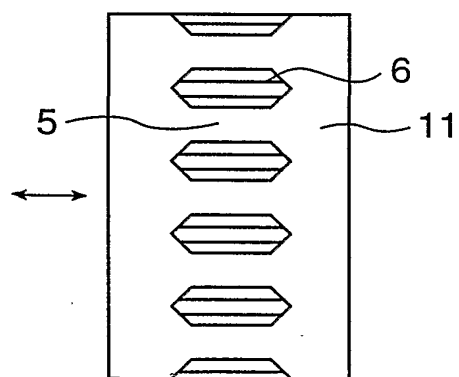
F i g.17



F i g.18

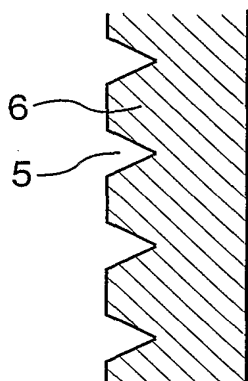


F i g.19

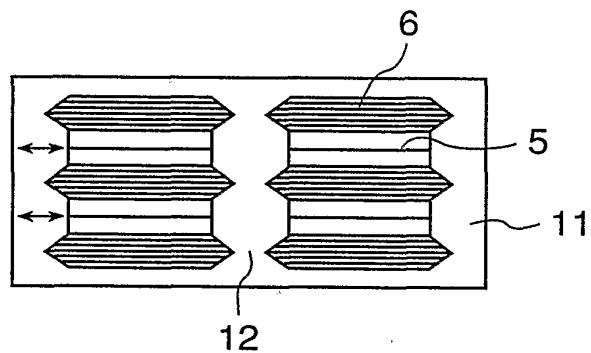




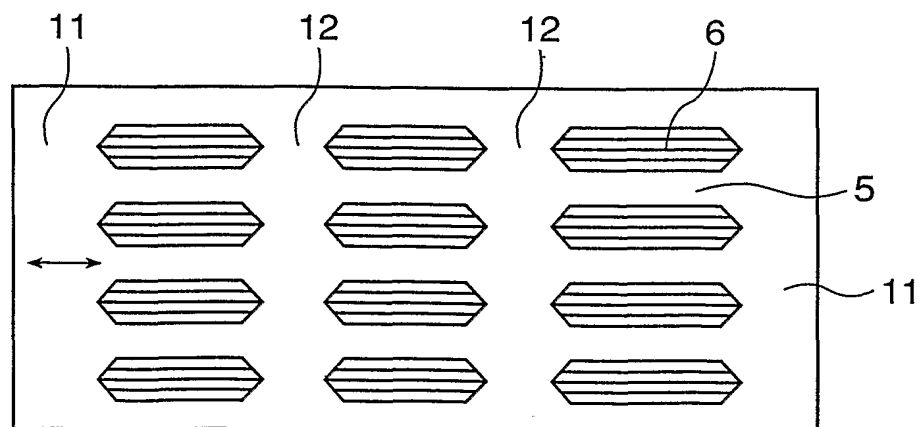
F i g .20



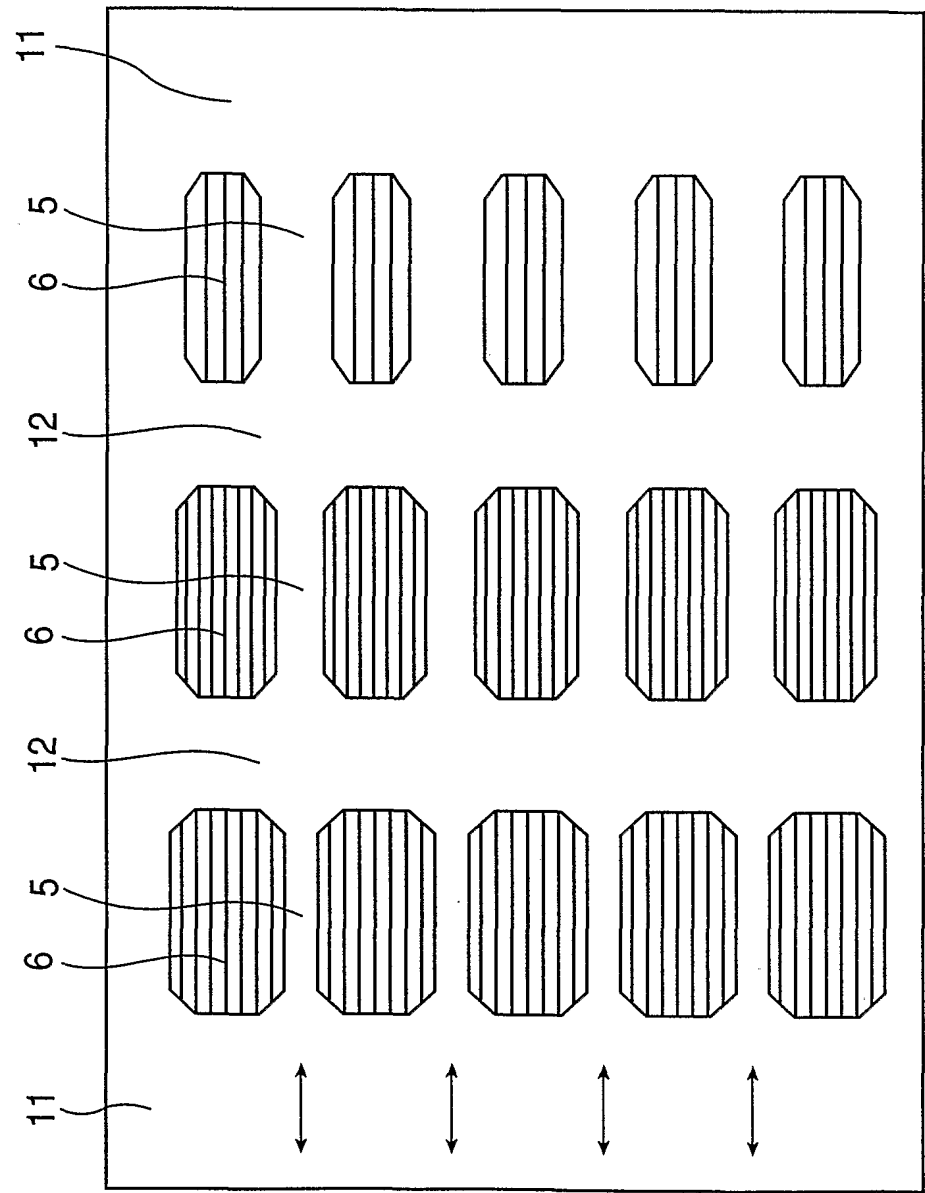
F i g .21



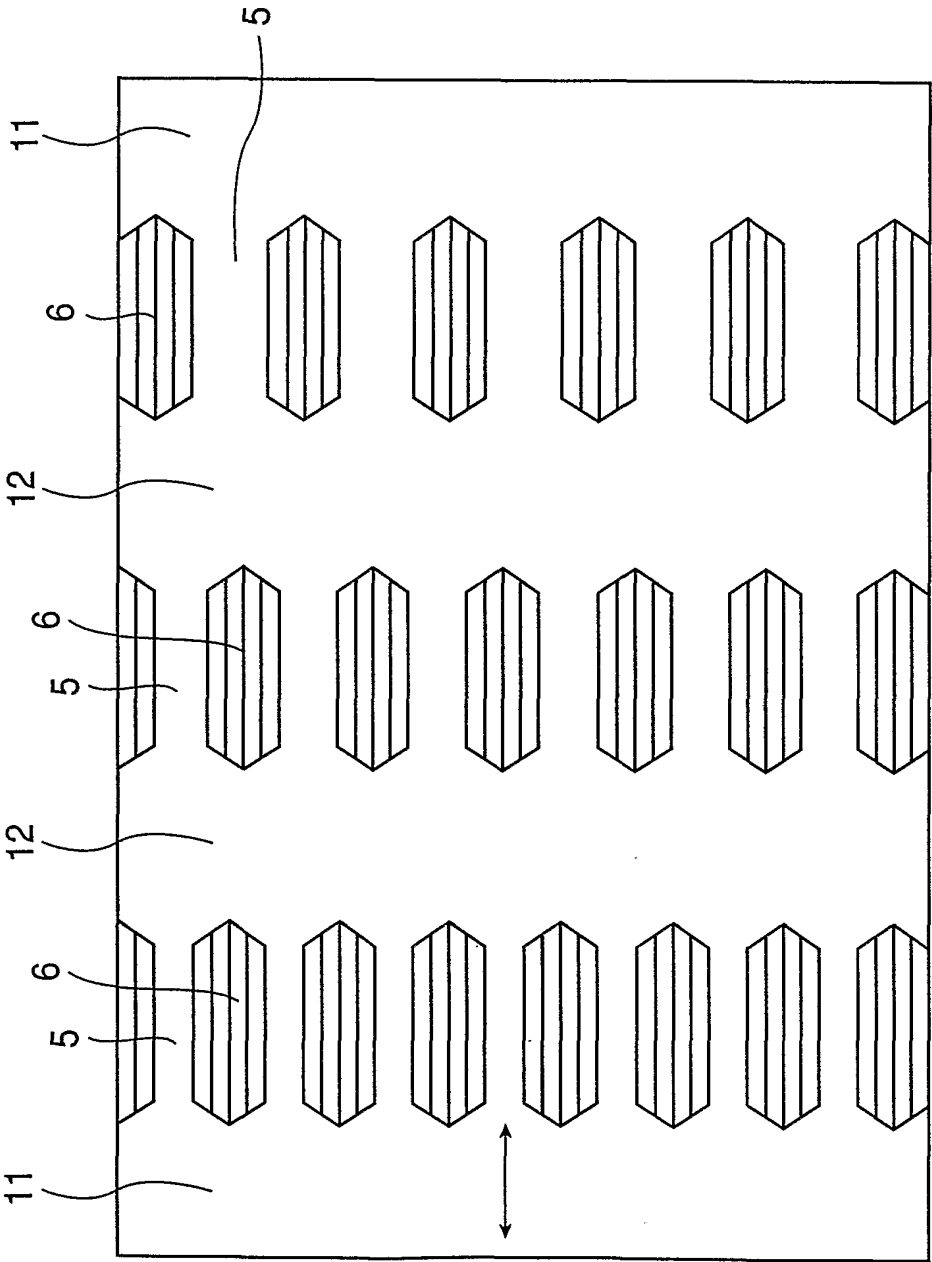
F i g .22



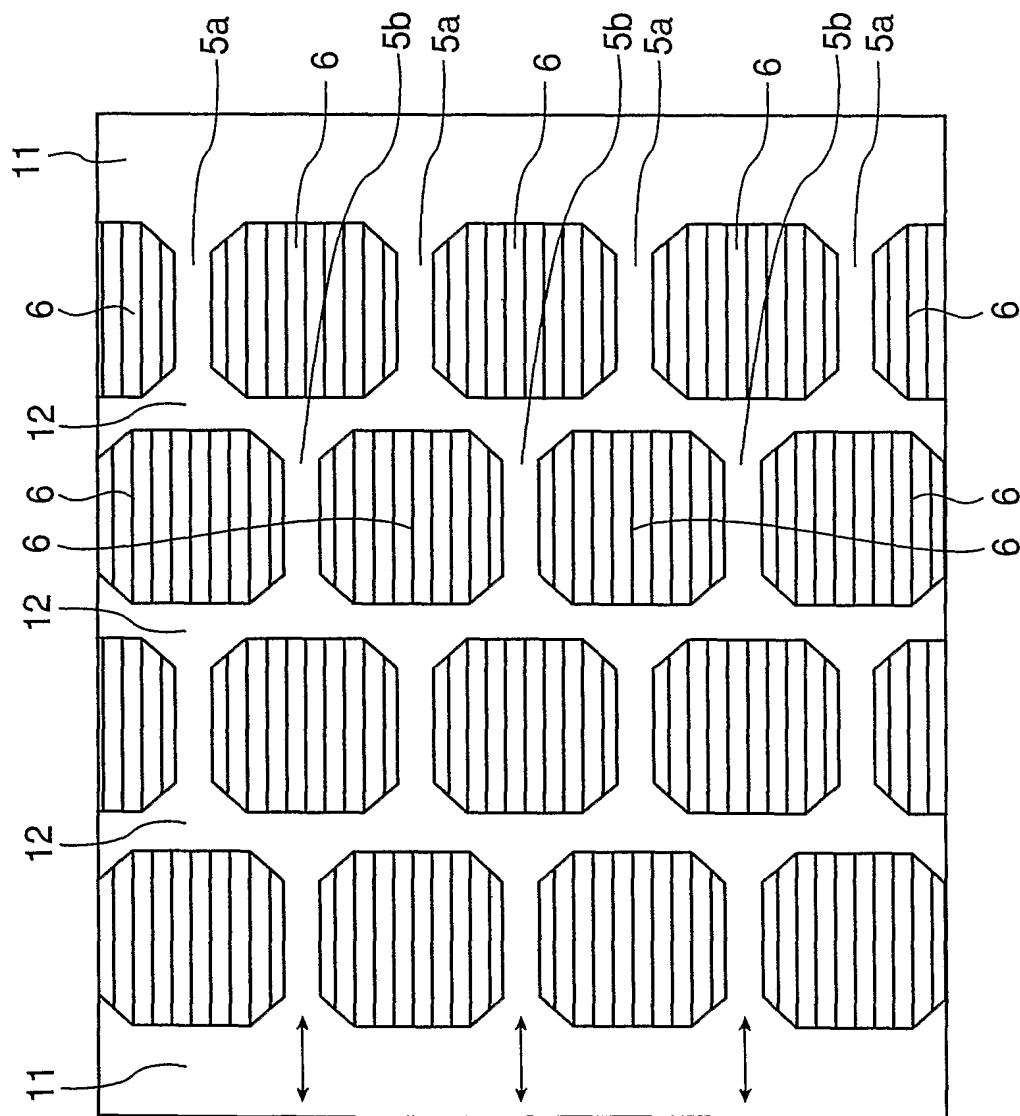
F i g .23



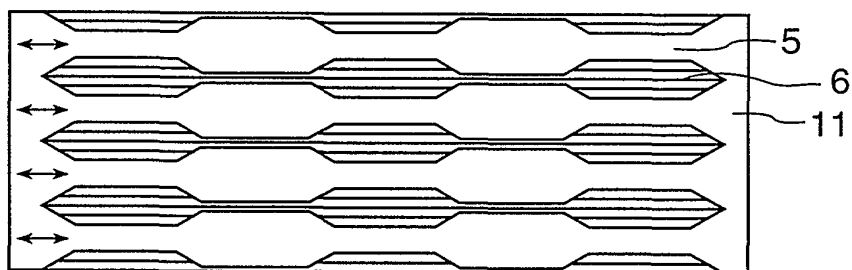
F i g .24



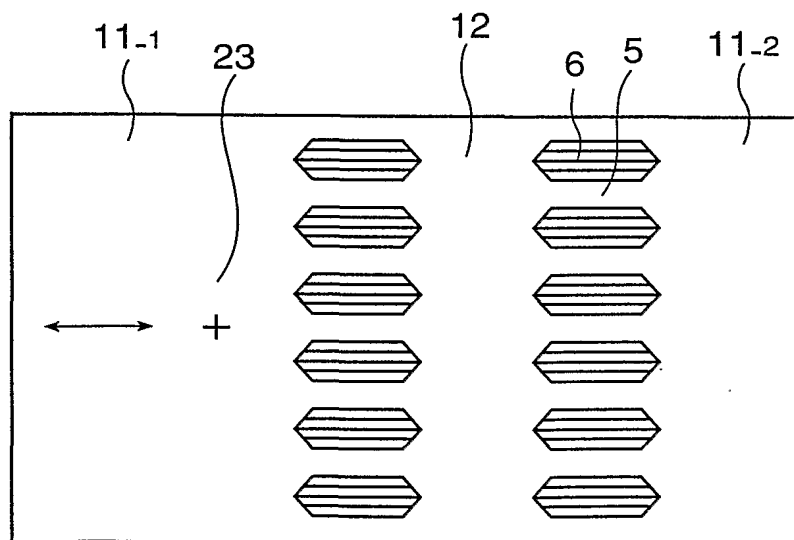
F i g .25



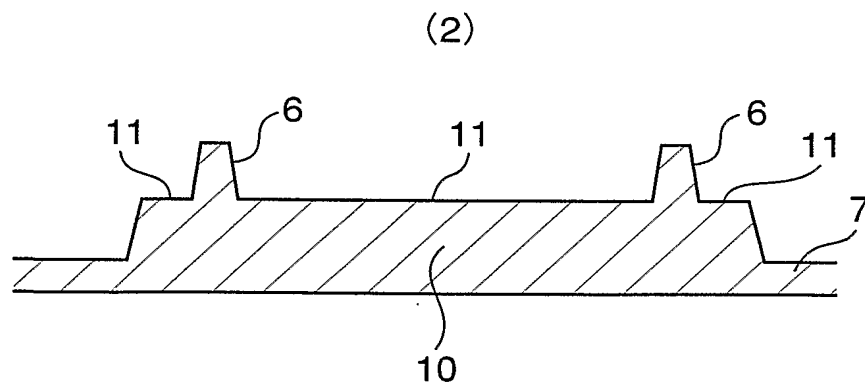
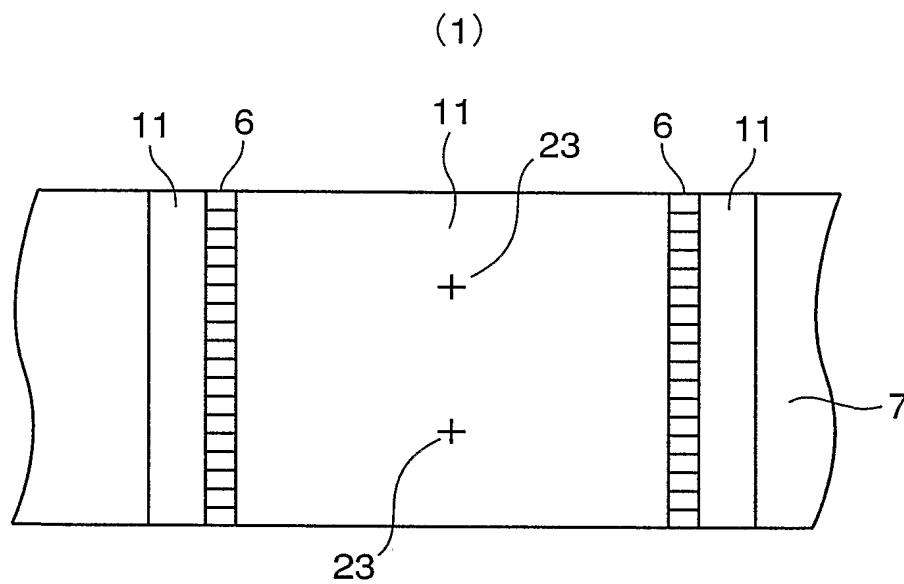
F i g .26



F i g .27

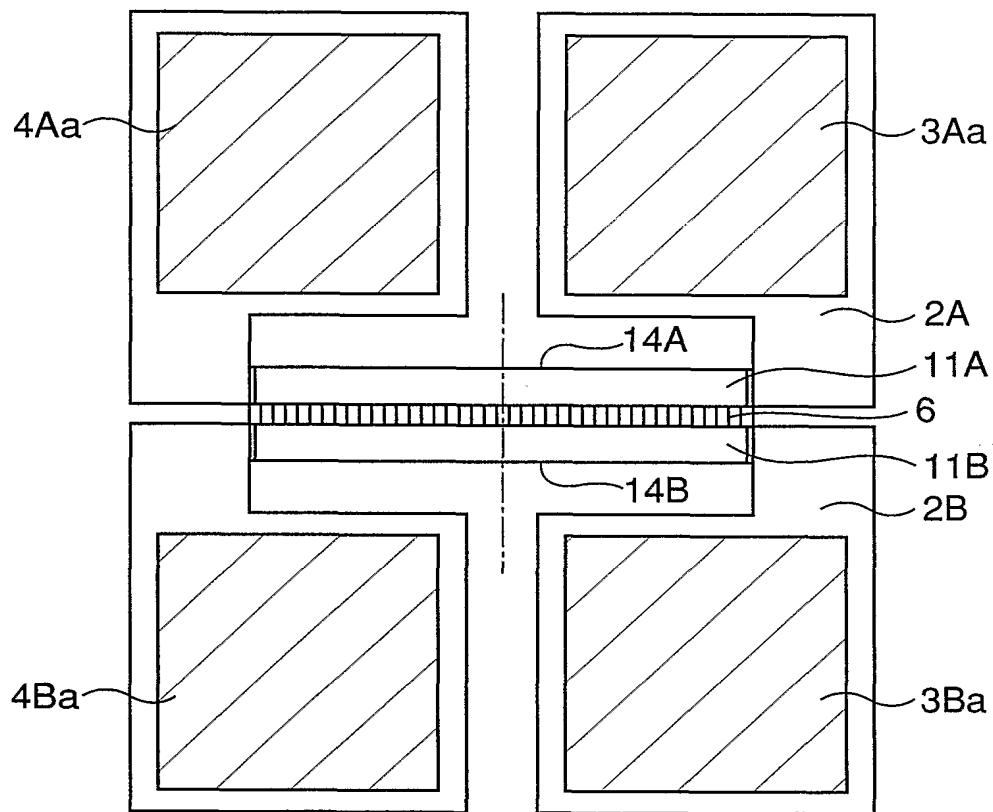


F i g .28

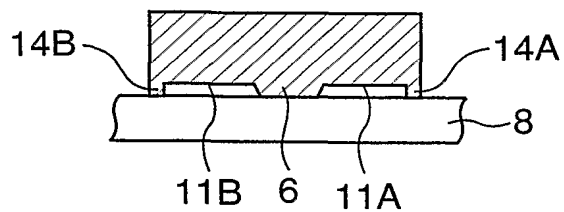


F i g .29

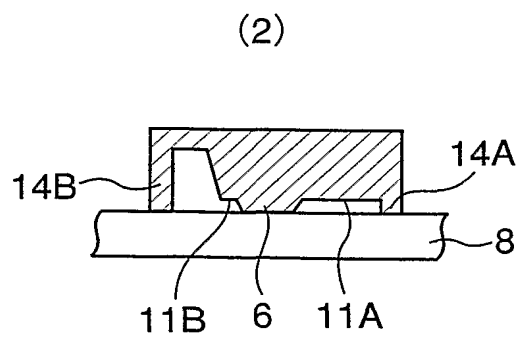
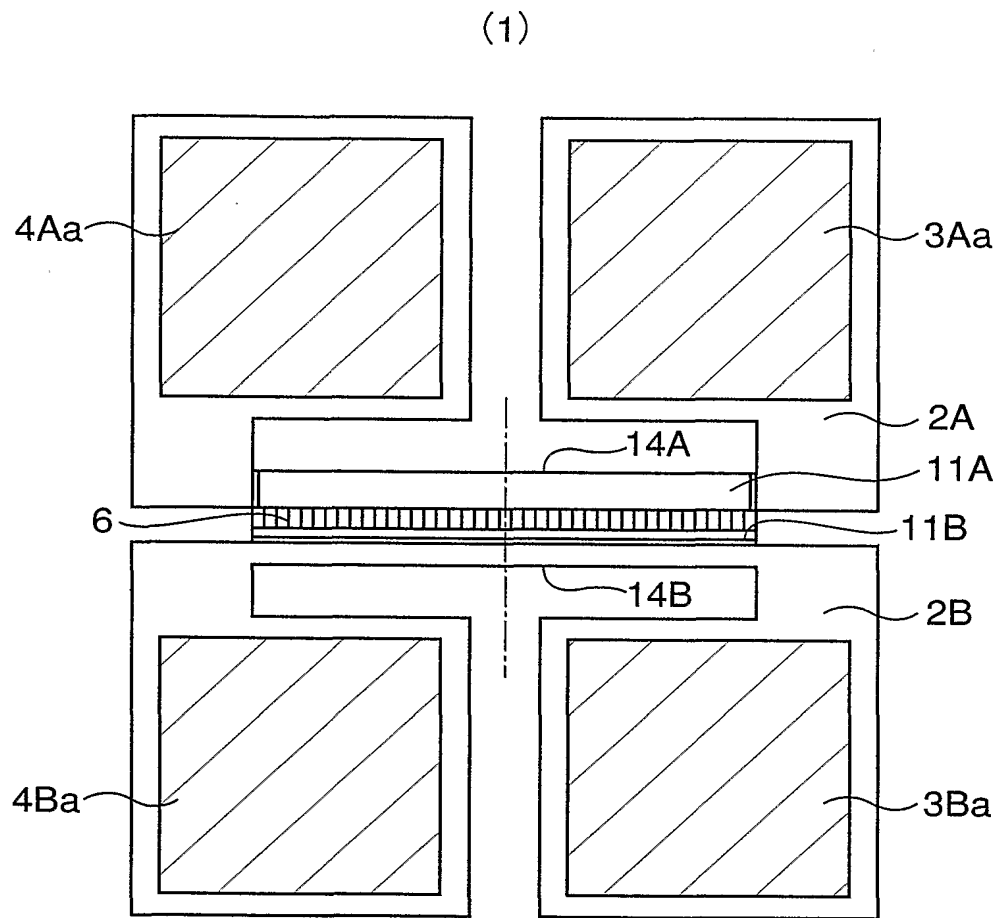
(1)



(2)

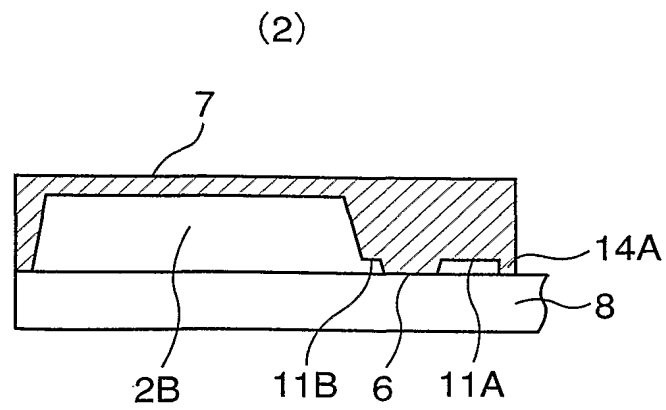
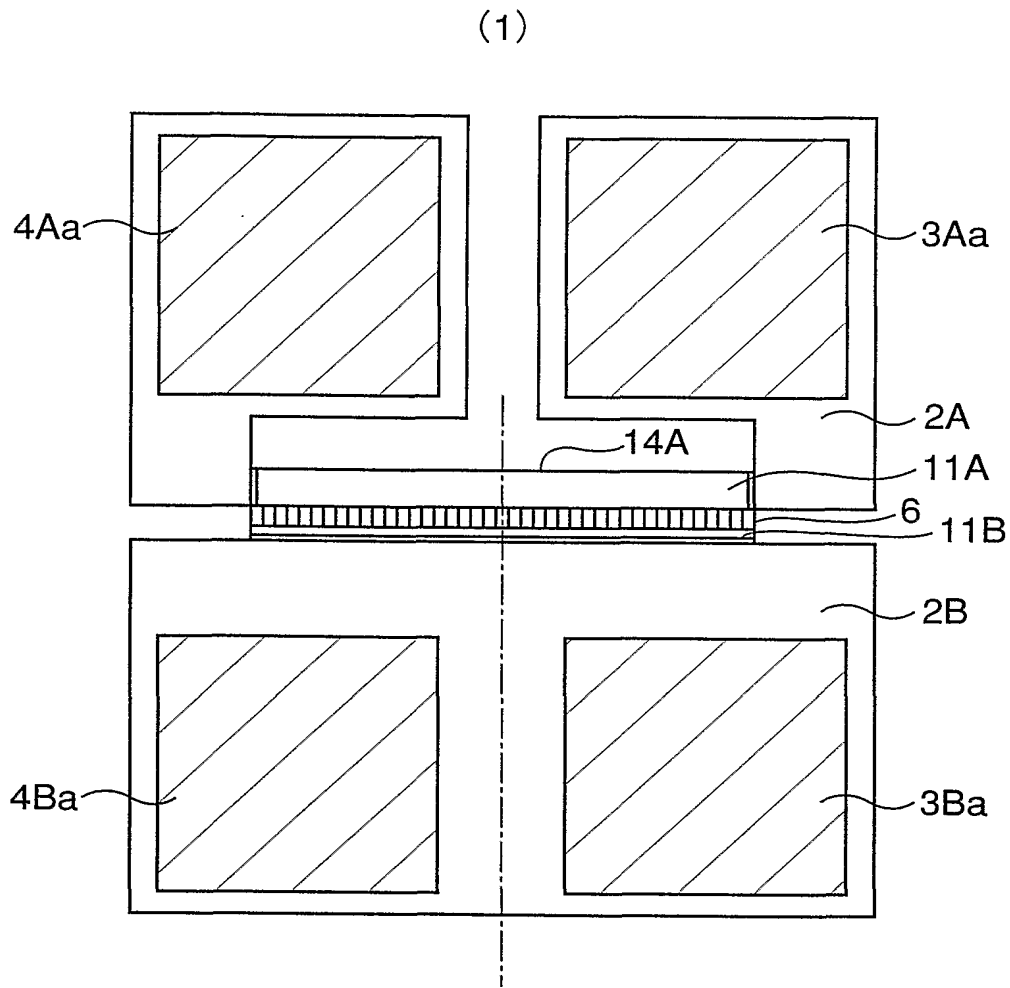


F i g .30

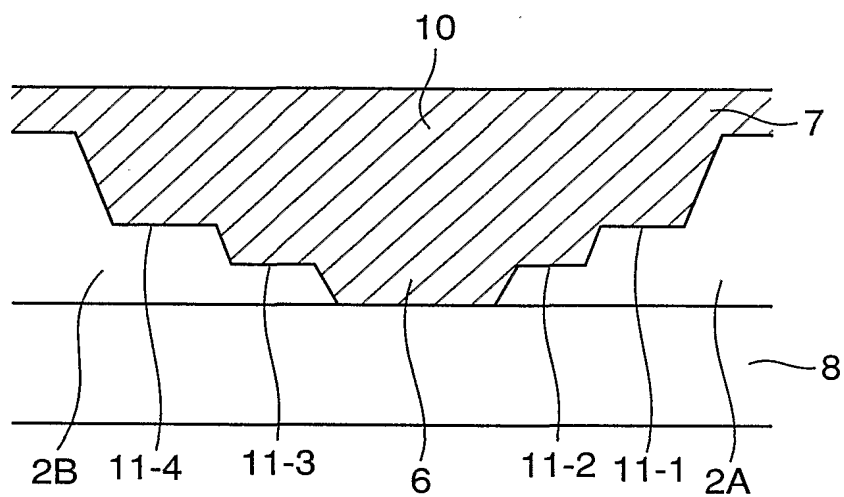




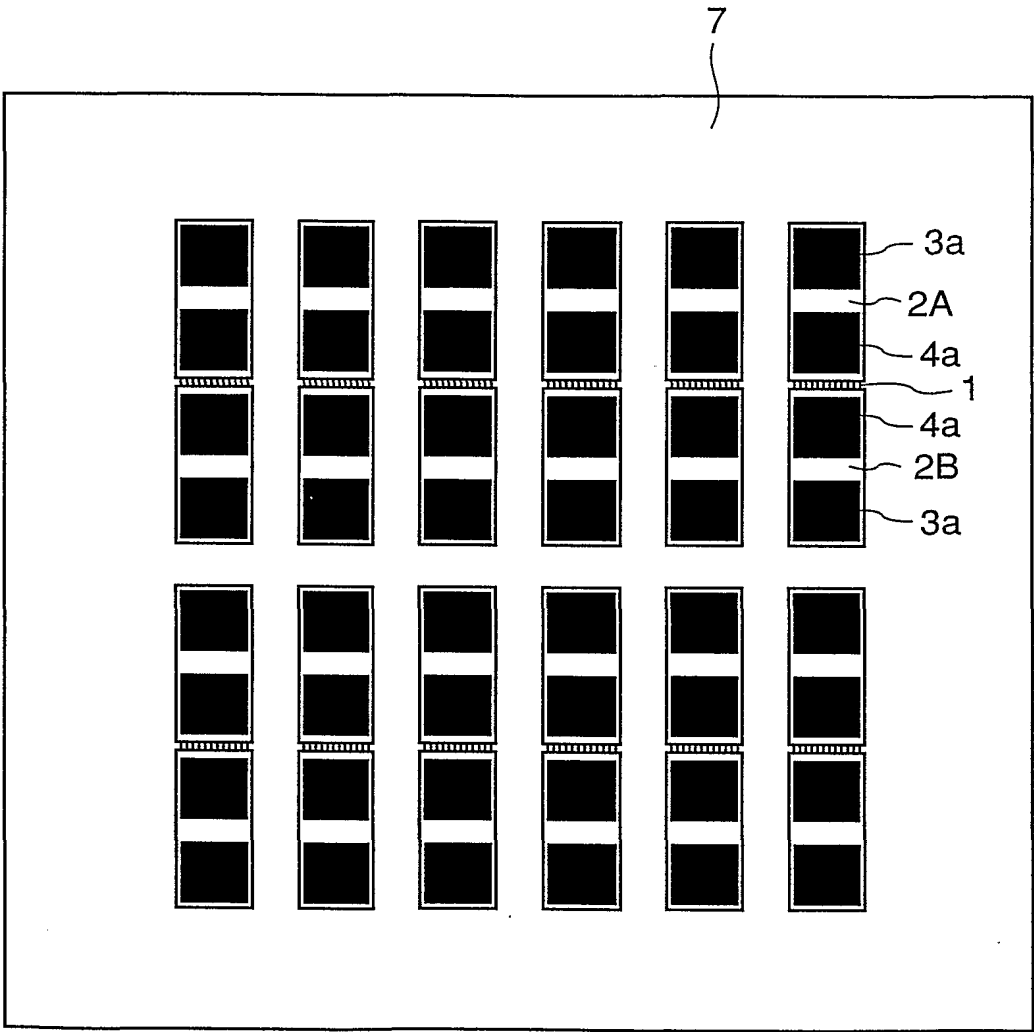
F i g .31



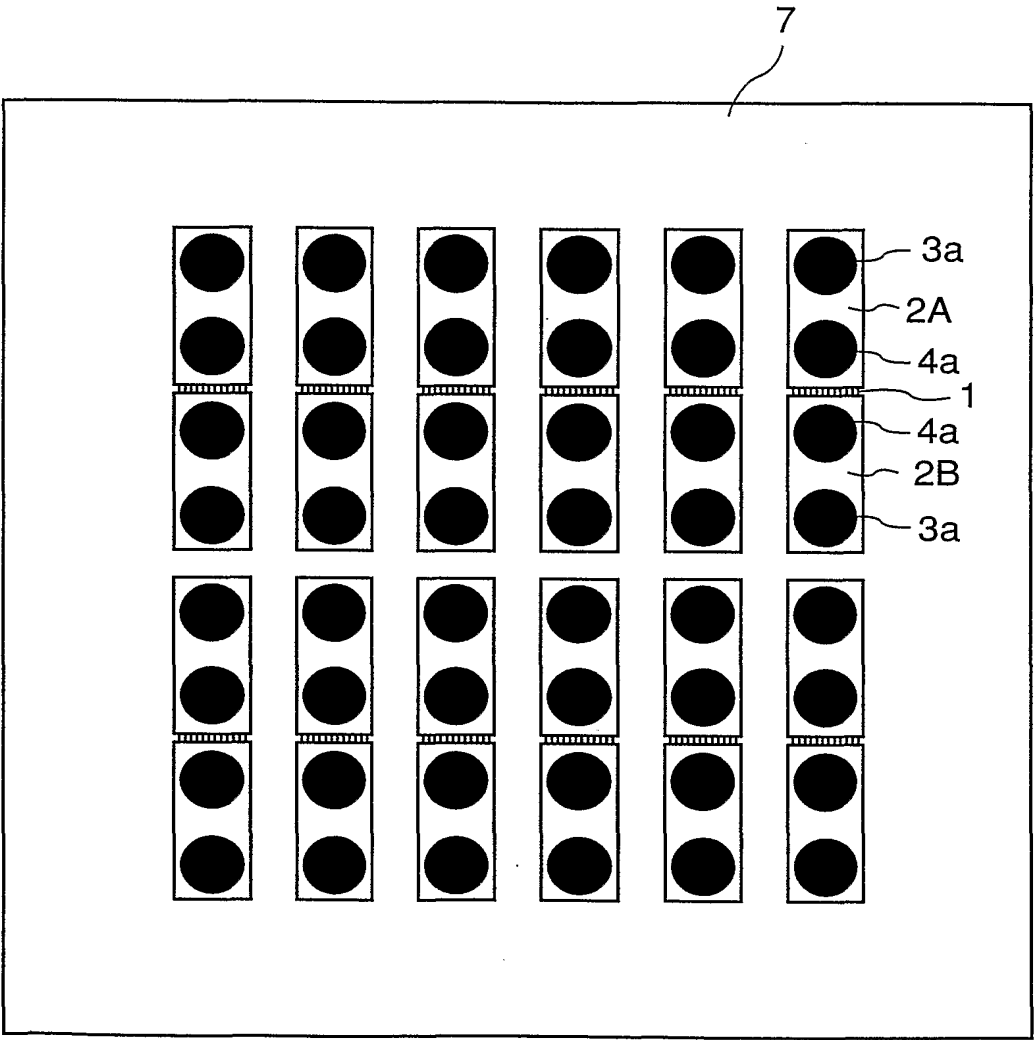
F i g .32



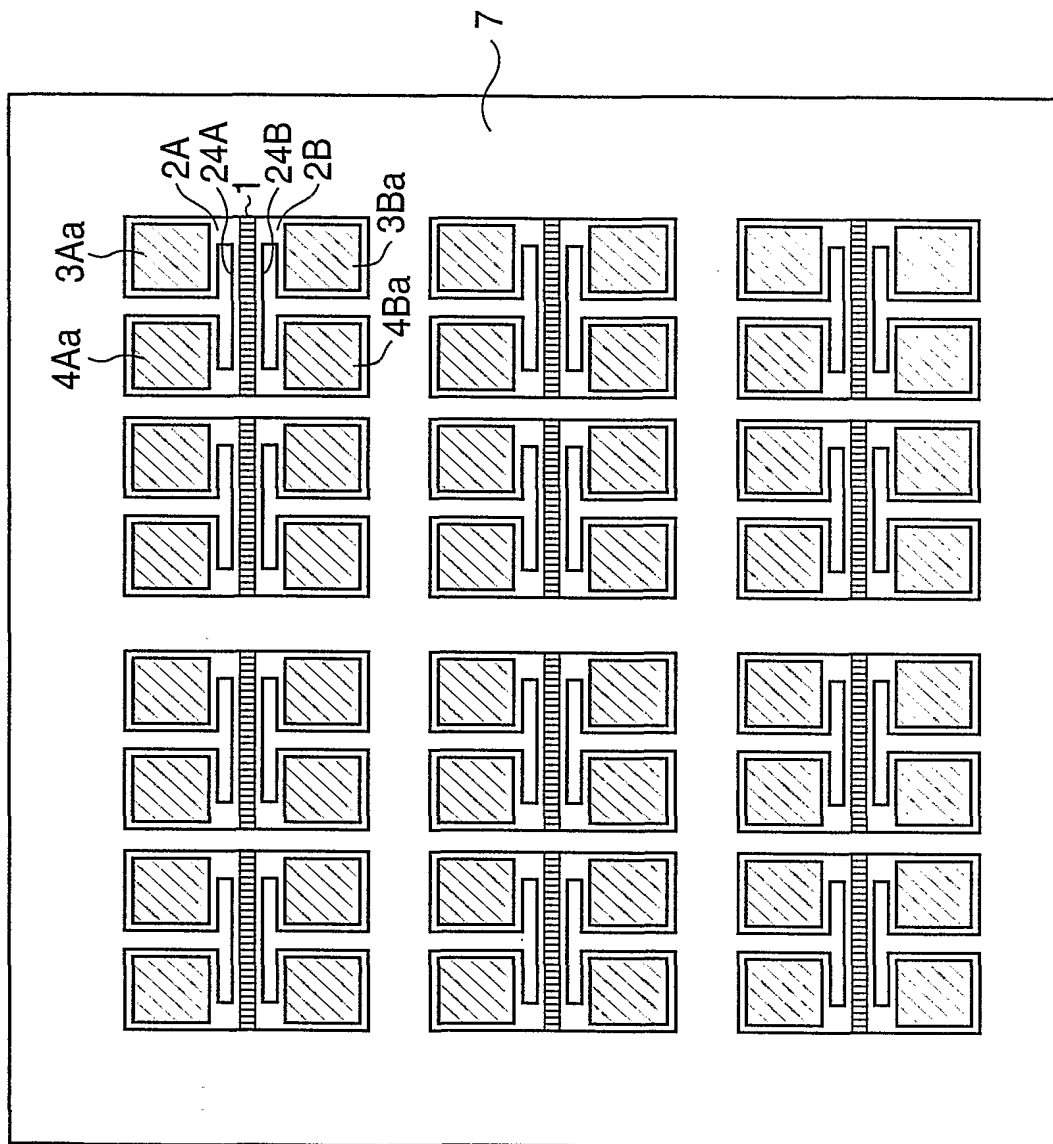
F i g .33



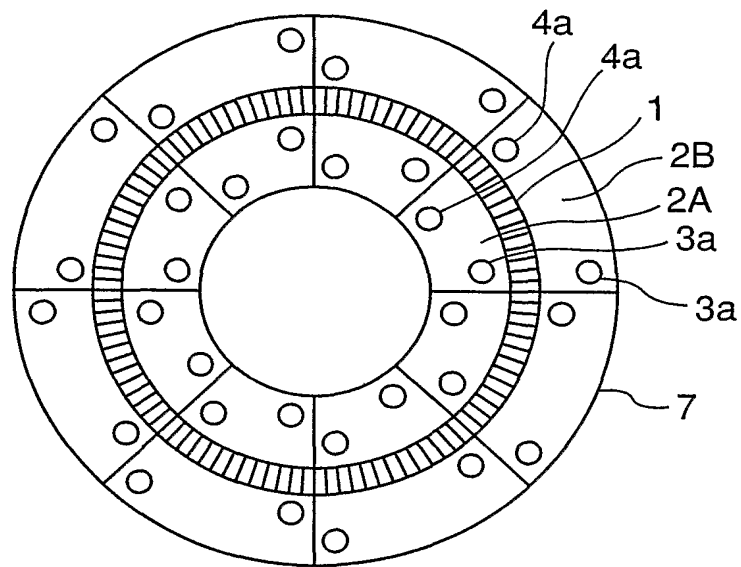
F i g .34



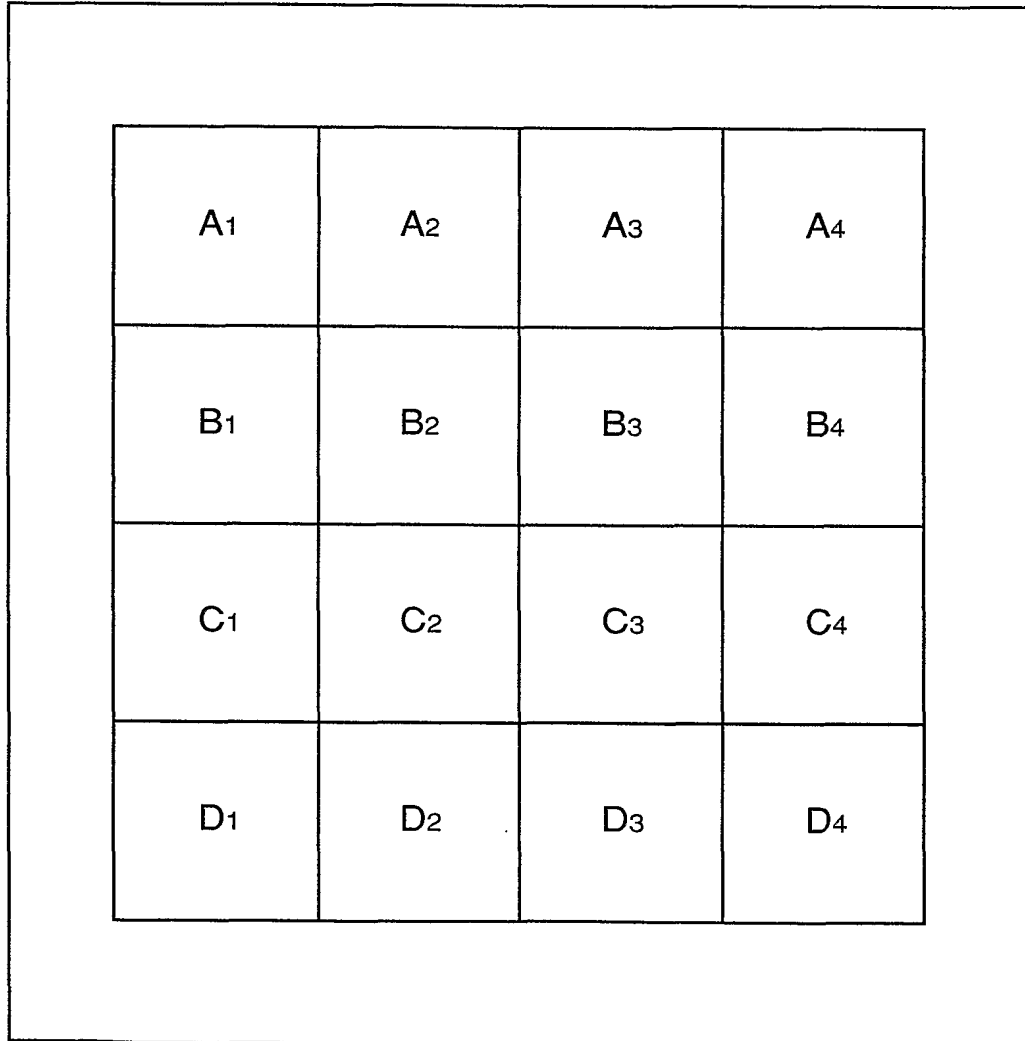
F i g .35



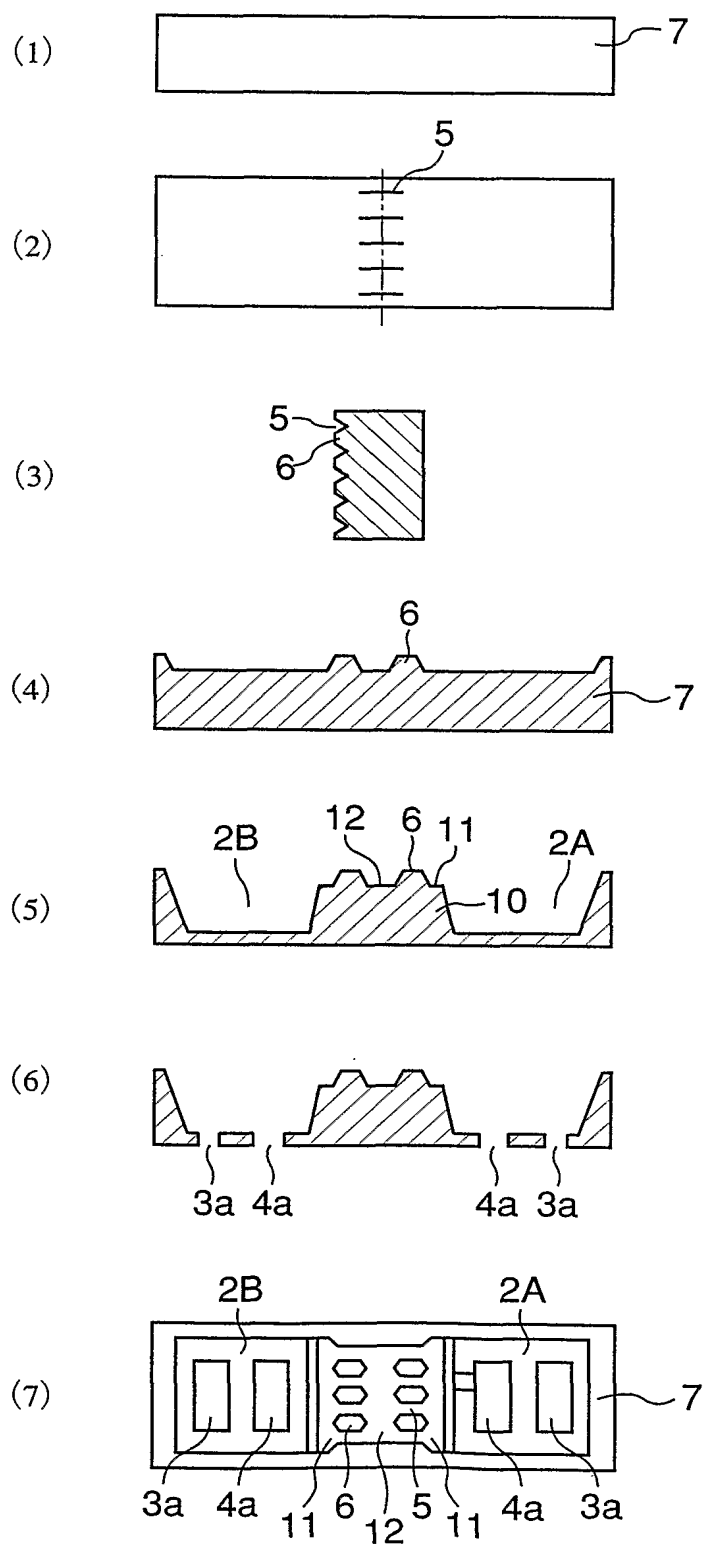
F i g .36



F i g .37

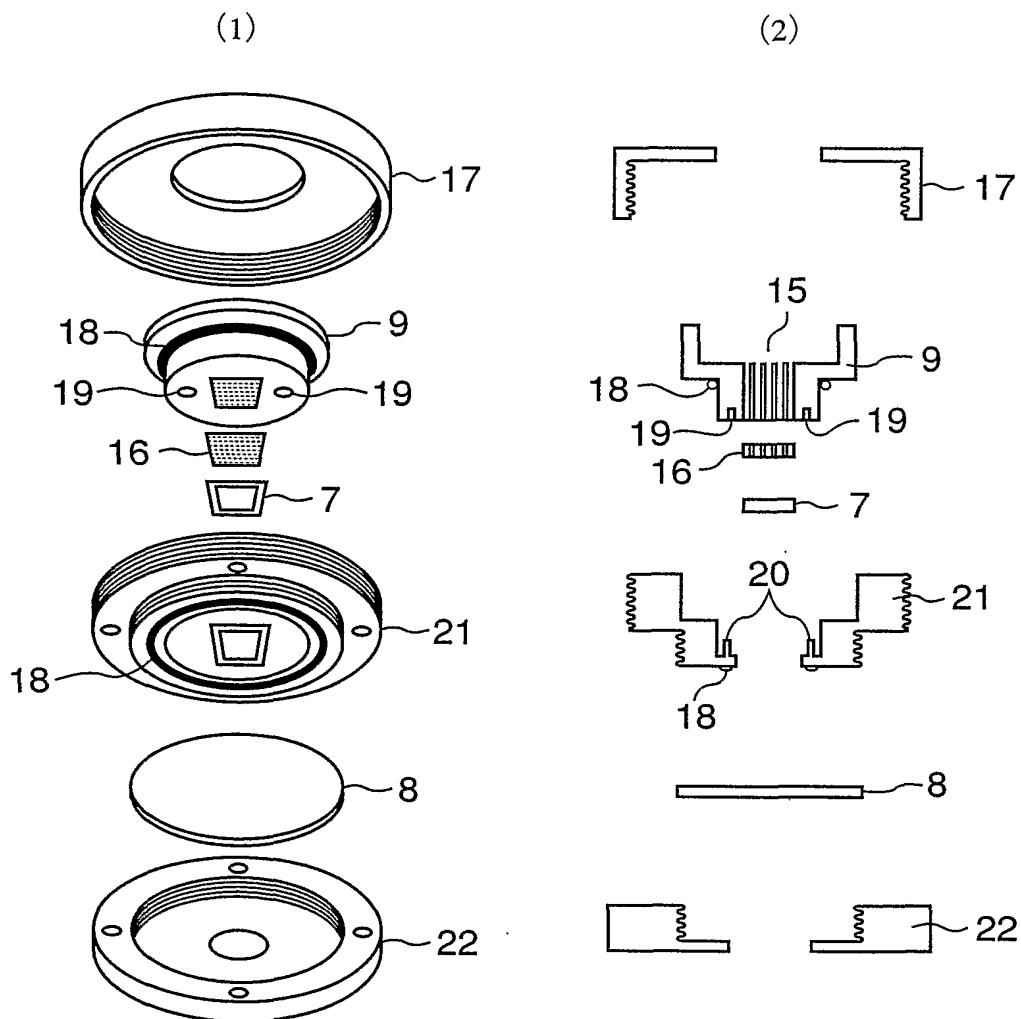


F i g .38

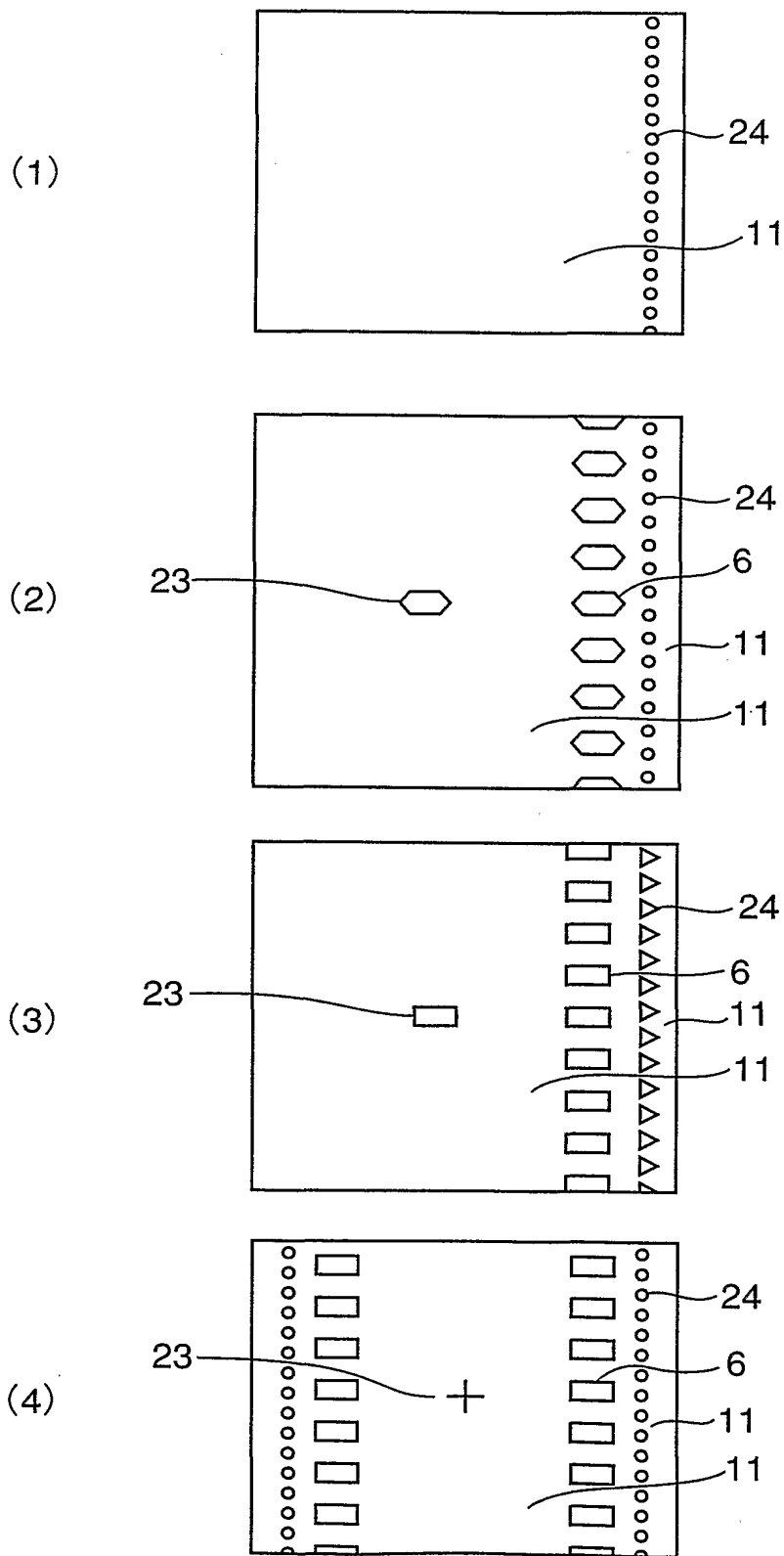




F i g .39



F i g .40



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10683

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12M1/32, 1/34, G01N33/48, 33/49, B81B1/00, B81C5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12M1/00-1/42, G01N33/48-33/49

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 8-23967, A (Hamamatsu Photonics K.K.), 30 January, 1996 (30.01.96), & JP 2685119 B2	1-19
A	JP, 3-257366, A (Yuji KIKUCHI), 15 November, 1991 (15.11.91), & JP 2532707 B2	1-19
A	JP, 11-165062, A (Director General of National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries), 22 June, 1999 (22.06.99), & JP 3089285 B2	1-19
A	EP, 368241, A2 (Hitachi, Ltd.), 16 May, 1990 (16.05.90), & EP 368241 B1 & JP 2-130471 A & JP 2685544 B2 & US 5023054 A & DE 68918223 E	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
08 March, 2002 (08.03.02)Date of mailing of the international search report  
19 March, 2002 (19.03.02)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10683

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 94/16098, A1 (Neuro Probe, Inc.), 21 July, 1994 (21.07.94), & US 5284753 A & EP 679195 A1 & JP 8-505530 A	1-19
A	WO, 96/03206, A1 (E. I. Du Pont De Nemours And Co.), 08 February, 1996 (08.02.96), & US 5595712 A & EP 772490 A1 & EP 772490 B1 & JP 10-503708 A & BR 9508431 A & KR 97704510 A & DE 69505986 E & RU 2149054 C1	1-19
A	JUNGER, W.G. et al., Improved rapid photometric assay for quantitative measurement of PMN migration, Journal of Immunological Methods, 15 March, 1993 (15.03.93), Vol.160, No.1, pages 73 to 79	1-19

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12M1/32, 1/34, G01N33/48, 33/49, B81B1/00, B81C5/00,

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12M1/00-1/42, G01N33/48-33/49

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 8-23967 A (浜松ホトニクス株式会社) 1996. 01. 30 & JP 2685119 B2	1-19
A	JP 3-257366 A (菊池佑二) 1991. 11. 15 & JP 2532707 B2	1-19
A	JP 11-165062 A (農林水産省食品総合研究所長) 1999. 06. 22 & JP 3089285 B2	1-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.03.02

国際調査報告の発送日

19.03.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

4B

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 368241 A2 (HITACHI, LTD.) 1990.05.16 & EP 368241 B1 & JP 2-130471 A & JP 2685544 B2 & US 5023054 A & DE 68918223 E	1-19
A	WO 94/16098 A1 (NEURO PROBE, INC.) 1994.07.21 & US 5284753 A & EP 679195 A1 & JP 8-505530 A	1-19
A	WO 96/03206 A1 (E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 1996.02.08 & US 5595712 A & EP 772490 A1 & EP 772490 B1 & JP 10-503708 A & BR 9508431 A & KR 97704510 A & DE 69505986 E & RU 2149054 C1	1-19
A	JUNGER, W.G. et al., Improved rapid photometric assay for quantitative measurement of PMN migration, Journal of Immunological Methods, March 15, 1993, Volume 160, Number 1, pages 73-79	1-19